



**Caractérisation et implication de l'autophagie au cours
de la différenciation macrophagique des monocytes.
Application à la Leucémie Myélomonocytaire Chronique**
Sandrine Obba

► **To cite this version:**

Sandrine Obba. Caractérisation et implication de l'autophagie au cours de la différenciation macrophagique des monocytes. Application à la Leucémie Myélomonocytaire Chronique. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4035 . tel-01175991

HAL Id: tel-01175991
<https://theses.hal.science/tel-01175991>

Submitted on 13 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Présentée par Sandrine OBBA

Pour obtenir le titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

**Caractérisation et implication de l'Autophagie au cours de la
différenciation macrophagique des monocytes
Application à l'étude de la
Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC)**

Thèse soutenue le 24 Juin 2015, à Nice, devant le jury composé de :

Dr Frédéric BOST

Président

Dr Patrice CODOGNO

Rapporteur

Dr Patrice DUBREUIL

Rapporteur

Pr Eric SOLARY

Examineur

Dr Benoit VIOLLET

Examineur

Dr Arnaud JACQUEL

Co-Directeur

Dr Patrick AUBERGER

Directeur

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »

Aristote

SOMMAIRE

SOMMAIRE

LISTE DES ABRREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION	14

I - Des monocytes aux Macrophages15

A. L'origine des monocytes.....	15
B. Caractérisation et Fonctions des monocytes	15
C. La différenciation du monocyte en macrophage	17
1. La migration vers les tissus.....	17
2. Le récepteur au CSF-1	18
a. Généralités sur le CSF-1R	18
b. Les voies de signalisation activées par le CSF-1R	19
3. Les macrophages.....	20
a. La polarisation pro-inflammatoire (macrophages de type M1).....	21
b. La polarisation anti-inflammatoire (macrophages de type M2)	22

II - Caspases et Autophagie dans les processus cellulaires23

A. Les Caspases	23
1. Définition.....	23
2. Implication et rôles physiologiques.....	23
a. La mort cellulaire programmée : Apoptose.....	23
a1. La voie intrinsèque de l'apoptose	24
a2. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	25

b.	Fonctions non apoptotiques des Caspases	26
b1.	Caspases et Inflammation	26
b2.	Caspases et Différenciation.....	27
b2.1.	La Différenciation Erythrocytaire	27
b2.2.	La Différenciation macrophagique.....	28
3.	Implication des Caspases dans la Carcinogénèse	30
B.	L'Autophagie	31
1.	Définition.....	31
2.	Les différentes formes d'Autophagie	32
a.	La Macroautophagie ou Autophagie	32
b.	La Microautophagie.....	33
c.	L'Autophagie Médiée par les Chaperonnes.....	33
d.	La Crinophagie	34
3.	La régulation de l'Autophagie	34
a.	L'Initiation	34
b.	La Nucléation	35
c.	L'Elongation - Maturation	38
c1.	Le système de conjugaison ATG5-ATG12	39
c2.	Le système de conjugaison ATG8-PE	39
4.	Les voies de signalisation régulant l'Autophagie	41
a.	La voie inhibitrice : mTOR.....	41
a1.	Le complexe mTORC1 et sa régulation.....	42
a2.	mTORC et Autophagie	42
a1.1.	mTORC1.....	42
a1.2.	mTORC2.....	43
b.	La voie activatrice : AMPK	44

b1. La composition du complexe AMPK.....	44
b2. La Régulation de l'activation de l'AMPK	45
b3. AMPK et la régulation de l'Autophagie.....	47
5. Fonctions physiologiques de l'Autophagie	48
a. Activation catabolique basale nécessaire à l'homéostasie cellulaire et tissulaire	48
b. Implication de l'autophagie au cours du développement et de la différenciation cellulaire	49
b1. Autophagie et développement	50
b1.1. La Transition Ovocyte/Embryon	50
B1.2. La Survie Post-Natale	51
b2. Autophagie et Différenciation Cellulaire.....	51
b2.1. La Différenciation Erythrocytaire	51
b2.2. La Différenciation Mégacaryocytaire	53
b2.3. La Différenciation Lymphocytaire	54
6. Implication de l'autophagie dans les pathologies.....	56
a. Les rôles de l'autophagie dans les Cancers	57
b. Autophagie et Maladies neuro-dégénératives.....	59
b1. La maladie d'Alzheimer	59
b2. La maladie de Parkinson.....	60
c. Autophagie et Maladie Myodégénérative : Maladie de Danon	61
III - Dialogue entre les caspases et l'autophagie	62
A. La régulation de l'autophagie par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	62
B. L'inhibition de l'autophagie par les acteurs de la voie extrinsèque de l'Apoptose	64
C. La régulation de l'Apoptose par le clivage des protéines autophagiques	65

1. Le Clivage de Beclin et de ses partenaires pro-autophagiques	65
2. Les fonctions ambivalentes d'Atg5 et Atg4D	66
D. L'activation des caspases par l'autophagosome	67

IV - Les récepteurs Purinergiques67

A. Généralités	67
B. P1-R	68
C. P2RX	68
D. P2RY.....	69
1. P2RY et leurs fonctions.....	69
2. Les Récepteurs Purinergiques, leurs fonctions physiologiques et les pathologies associées.....	70
a. Leurs fonctions physiologiques	70
a1. Le P2RY2	70
a2. P2RY1 - P2RY12 et agrégation plaquettaire	71
a3. Le P2RY6	71
b. Leurs implications dans les pathologies.....	72
b1. P2RY12 et P2RY2, impliqués dans le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses.....	72
b2. P2RY et Cancers.....	73
b3. P2RY2 et mucoviscidose.....	73

V - Leucémie MyéloMonocytaire Chronique.....74

A. Généralités sur la LMMC.....	74
B. La physiopathologie de la LMMC	75
1. Les anomalies associées	75
a. Les causes cytogénétiques	75

b. Les mutations génétiques	76
b1. Les mutations dans les gènes régulant la synthèse de l'ADN	76
b1.1. Les mutations affectant la méthylation de l'ADN	76
b1.2. Les mutations affectant les histones	77
b2. Les mutations impliquées dans la voie du spliceosome	78
b3. Les mutations des facteurs de transcription	78
2. Une signalisation cellulaire altérée	78
a. Les mutations de RAS	79
b. Les mutations de CBL	79
c. La mutation JAK2 V617F	80
d. Les mutations FLT3	80
C. La composante Immunitaire : Les MDSC	80
1. Définitions	80
2. La caractérisation des MDSC tumorales	81
3. Les fonctions Immunosuppressives des MDSC	81
4. Les MDSC et hémopathies malignes	82
a. Les MDSC dans le Myélome multiple	82
b. Les MDSC dans les Leucémies	83
c. Les MDSC dans la LMMC	84
D. Traitements	84
1. L'allogreffe	85
2. Les agents thérapeutiques pharmacologiques	85

RESULTATS.....87

Résumé article 1.....88

Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions.

Arnaud JACQUEL, Sandrine OBBA, Laurent BOYER, Maëva DUFIES, Guillaume ROBERT, Pierre GOUNON, Emmanuel LEMICHEZ, Frederic LUCIANO, Eric SOLARY, and Patrick AUBERGER.
BLOOD, 2012

Résumé article 2.....90

The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML.

Sandrine OBBA, Zoheir HIZIR, Laurent BOYER, Dorothée SELIMOGLU-BUET, Anja PFEIFER, Gregory MICHEL, Amine HAMOUDA, Diogo GONCALVES, Michaël CEREZO, Sandrine MARCHETTI, Stéphane ROCCHI, Nathalie DROIN, Thomas CLUZEAU, Guillaume ROBERT, Frederic LUCIANO, Bernard ROBAYE, Marc FORETZ, Benoit VIOLLET, Laurence LEGROS, Eric SOLARY, Arnaud JACQUEL[†], Patrick AUBERGER[†] 5[†]: Contribution équivalente à ce travail)
Autophagy, 2015

Revue 1.....92

Proper macrophagic differentiation requires both autophagy and caspase activation.

Arnaud JACQUEL[†], Sandrine OBBA[†], Eric SOLARY and Patrick AUBERGER.([†]: Contribution équivalente à ce travail) **Autophagy, 2012**

Revue 2.....93

Implication de l'autophagie au cours du développement et de la différenciation cellulaire.

Sandrine OBBA, Thomas CLUZEAU, Alexandre PUISSANT, Guillaume ROBERT¹, Frédéric LUCIANO, Patrick AUBERGER, Arnaud JACQUEL. **Hématologie (soumis)**

ANNEXES.....	149
---------------------	------------

ARTICLE 3	150
------------------------	------------

Targeting cancer stem cells expressing an embryonic signature with anti-proteases to decrease their tumor potential.

CY. Darini, P. Martin, S. Azoulay, MD. Drici, P. Hofman, **S. Obba**, C. Dani, A. Ladoux. **Cell Death and Diseases**, 2013

ARTICLE 4	151
------------------------	------------

Escherichia coli α -Hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the RhoGTPase activating toxin CNF1 during bacteremia.

M. Diabate, P. Munro, E.Garcia, A. Jacquiel, G.Michel, **S. Obba**, D.Goncalves, C. Luci, S. Marchetti, D. Demon, C. Degos, Y. Bechah, J-L Mege, M Lamkanfi, P. Auberger, J-P Gorvel, L.M. Stuart , L. Landraud, E. Lemichez and L. Boyer **PLOS Pathogens** , 2015

RÉSUMÉ	152
---------------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α-AID	Subunit- α Auto Inhibitory Domain
α-CTD	Subunit- α Carboxy Terminal Domain
α-KD	Subunit- α Ketoglutarate Dehydrogenase complex
α-syn	α -synuclein
β-CBM	Subunit - β - Carbohydrate-Binding Module
β-CTD	Subunit- β C Terminal Domain
ADP	Adénosine Diphosphate
AKT	Protéine Kinase B
AMBRA1	Activating Molecule in BECN1-Regulated Autophagy Protein 1
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK	5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase
APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ARG1	Arginase 1
ARN	Acide Ribonucléique
ASXL1	Additional Sex Combs Like 1
ATG	Autophagy Related genes
ATP	Adénosine-5'-Triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Aβ	Amyloid beta
Bad	Bcl-2 associated death promoter
BaF3	Murine interleukin-3 dependent pro-B cell line
Bak	Bcl-2 antagonist Killer
BARKOR	Beclin1 Associated Atg Key Regulator
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-B	B-cell lymphoma B
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	B-cell Receptor

BCR-ABL	Break point Cluster Region-Abelson
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bif-1	Bax interacting factor 1
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophage
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3-Like
Bok	Bcl-2 related ovarian killer
CaMKKβ	Ca ²⁺ /calModulin-dependent protein Kinase Kinase beta
Caspase	CysteinyI-aspartate-cleaving proteases
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CBS1	Cystathionine β -Synthase
CCD	Coiled-Coil Domain
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Receptor
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CFU	Colony Forming Unit
c-Kit	mast/stem cell growth factor receptor
CMA	Chaperone Mediated Autophagy
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRE	Cyclization REcombinase
CRE	cAMP Response Element
CSF-1	Colony-Stimulating Factor
CSF-1R	Colony-Stimulating Factor Receptor
CSF-2	Colony Stimulating Factor 2
c-src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
C-ter	Carboxyl-terminal
CX3CR1	CX3C Chemokine Receptor 1
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand
DAG	DiAcylGlycérol

DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAPK1	Death-Associated Protein Kinase 1
DD	Death Domain
Deptor	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DFCP1	Double FYVE-Containing Protein 1
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNMT3A	DNA Méthyl-Transférase 3 alpha
DR	Death Receptor
ECD	Evolutionarily Conserved Domain
ENaC	Epithelial sodium Channel
E-NTPDase	Ectonucleosides Triphosphates Diphosphohydrolases
Epo	Erythropoïétine
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FADD	FAS-Associated protein with Death Domain
FCγRII	Fc gamma Receptor IIB
FIP200	FAK-family Interacting Protein of 200 kDa
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
FLT3	Fms-Like Tyrosine Kinase 3
FoxO3	Forkhead box O3
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GABARAP	Gamma-AminoButyric Acid Receptor-Associated Protein
GAP	GTPase Activated Protein
GATA-1	GATA-binding factor 1
GATE16	Golgi-Associated ATPase Enhancer Of 16 KDa
GBL	G-protein Beta-subunit-Like
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
Gi	Protéines G inhibitrices

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
G-MDSC	Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells
GMP	Granulocyte-Monocyte Progenitor
Gq/G11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate
H3K27	Histone H3 methylated Lys27
h5mC	5-hydroxymethylation
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HeLa	Henrietta Lacks
HLA-DR	Human Leukocyte Antigens - Death Receptor
HRAS	Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog
hsc70	Heat shock cognate protein 70 (Constitutive)
HSP70	Heat shock cognate protein 70 (Induced)
HT-29	Human colon adenocarcinoma cells
hVps15	Human Vacuolar Protein Sorting
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IDO	Indoleamine-2,3-DiOxygenase
IFNγ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL13Rα	IL-13 Receptor α
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
JAK2	Janus Kinase 2
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KDa	Kilo-Dalton
KRAS	v-Ki-ras-2 Kirsten Rat sarcoma viral oncogene
LAM	Leucémie Aigüe Myéloïde
LAMP-2A	Lysosome-Associated Membrane Protein 2A

LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light Chain 3
LC8	Dynein light chain 1
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	Leukocyte Function-associated Antigen 1
LKB1	Liver Kinase B1
LLA	Leucémie Lymphoïde Aigüe
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMMC	Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
LPA	Lysophosphatidic Acid
LPA1	Lysophosphatidic Acid receptor
LPS	LipoPolySaccharide
m-3M3FBS	2,4,6-trimethyl-N-(meta-3-trifluoromethyl-phenyl)-benzenesulfonamide
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinases
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSFR	Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MEK	MAP/ERK Kinase
MEP	Megakaryocyte–Erythroid Progenitor
MG132	Carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal
miRNA	microRNA
mLST8	mammalian Lethal with SEC13 protein 8
M-MDSC	Monocytic-MDSC
MPP	Multipotent progenitor
MRC1	Mannose Receptor C de type 1
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC	Mammalian Target Of Rapamycin Complex
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NDP	Nucleoside diphosphate

NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural Killer cell
NMP	Nucleoside monophosphate
NO	Nitric Oxide
NPM	Nucleophosmin
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
N-ter	Amino terminal
NTP	Nucleoside triphosphate
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP1	Poly ADP-ribose Polymerase 1
PAS	Pre-Autophagosomal Structure
PDGF-R	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3KC3	Phosphatidylinositol 3-kinase de Classe III
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate
PRAS40	Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PROTOR	Protein observed with RICTOR
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PSEN1	Preseniline 1
PTP-ζ	Receptor-like protein-tyrosine phosphatase zéta
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis
Pyk-2	proline-rich tyrosine kinase 2
RAG	Ras regulated GTPase

RAPTOR	Regulatory associated protein of mTOR
RCPG	Recepteur Couplé aux Protéines G
RHEB	RAS Homologue Enriched in Brain
Rictor	Rapamycin insensitive
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
ROI	Réactifs Intermédiaires de l'Oxygène
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Recepteur Tyrosine Kinase
Rubicon	Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing <i>protein</i>
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
S100	S100 calcium-binding protein
S6K	S6 Kinase
SCF	Stem Cell Factor
SF3B1	Splicing Factor 3B
SFK	Src Family Kinase
SIN1	Stress-activated protein kinase-interacting protein 1
siRNA	Small interfering RNA
smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SNF1	Sucrose Non-fermenting 1
SOS	Son Of Sevenless
SQSTM1	Sequestosome 1
SR-A	Scavenger Receptors type 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STK11	Serine/threonine Kinase 11
STK36	Serine/threonine Kinase 36
TAK1	TGF β Activated Kinase 1
TCR	T cell Receptor
TET2	Ten-Eleven Translocation 2
TGFβ	Transforming Growth Factor- β
Th	Helper T Cells
TNF	Tumor Necrosis Factor

TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TPO	Thrombopoietin
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAIL-R1/2	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1 ou 2
Treg	Regulatory T Cells
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
U2AF1	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
UDP	Uridine 5'-diphosphate
ULK-1	Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UVRAG	UV Radiation Resistance Associate Gene
v-ATPase	Vacuolar-type H ⁺ -ATPase
VCAM1	Vascular Cell Adhesion protein 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very Late Antigen-4
VMP1	Vacuole Membrane Protein 1
VPS34	Vacuolar Protein Sorting 34
WIPIs	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1
Zp3	Zona pellucida 3
ZRSR2	Zinc finger (CCCH type) RNA-binding motif and serine/arginine rich 2
zVAD-fmk	Caspase family inhibitor

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	L'hématopoïèse	16
Figure 2.	L'hétérogénéité des monocytes : L'identification des sous-populations monocytaires	17
Figure 3.	L'Extravasation du monocyte	19
Figure 4.	Les voies de signalisation régulées par colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) dans les cellules myéloïdes	20
Figure 5.	Les macrophages et leur localisation tissulaire	21
Figure 6.	La polarisation macrophagique	23
Figure 7.	Les Caspases, Protéases à cystéine	24
Figure 8.	Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose	25
Figure 9.	Les membres de la famille Bcl-2	26
Figure 10.	Les caspases et leurs fonctions physiologiques	27
Figure 11.	Les quatre types d'autophagies présentes dans les cellules de mammifères	33
Figure 12.	Les différentes étapes de la formation d'un autolysosome	35
Figure 13.	L'étape d'initiation du phagophore	36
Figure 14.	L'étape de nucléation sous le contrôle des complexes dépendants de Beclin1	37
Figure 15.	Partenaires d'interaction du complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15	38
Figure 16.	Les systèmes de conjugaison de type ubiquitination Atg5-Atg12 et Atg8-PE (LC3-II)	39
Figure 17.	La régulation de mTORC1	44
Figure 18.	Structure de la protéine AMPK	45
Figure 19.	Modèle de mécanisme d'activation de l'AMPK	46
Figure 20.	Les voies de régulation positives et négatives de l'autophagie	48
Figure 21.	Défauts du développement des embryons invalidés pour l'autophagie	51
Figure 22.	Le rôle de l'autophagie dans le développement et la différenciation cellulaire chez les mammifères	52

Figure 23.	Les kinases DAPK et JNK régulent de l'autophagie	64
Figure 24.	La protéine Atg5 au carrefour entre apoptose et autophagie	65
Figure 25.	Le rôle du clivage par les caspases de la protéine Beclin1	67
Figure 26.	Le rôle du clivage d'Atg4 par les caspases	68
Figure 27.	L'activation des récepteurs purinergiques par les nucléotides extracellulaires	70
Figure 28.	Approche schématique du diagnostique différentiel de la monocytose présente dans le sang périphérique	75
Figure 29.	Caractéristiques phénotypiques des MDSC	82
Figure 30.	Sites de clivage de Beclin1	93
Figure 31.	Interrelation(s) caspases/autophagie au cours de la différenciation macrophagique	94
Figure 32.	Modèles d'activation de la caspase 8 durant la différenciation macrophagique	104
Figure 33.	Phénotypes des granulocytes immatures et des monocytes des patients atteints de LMMC	113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	L'hétérogénéité des monocytes : Phénotypes et fonctions des différentes sous-populations monocytaires	18
Tableau 2.	Les fonctions des macrophages tissulaires	22
Tableau 3.	Les protéines ATG, acteurs de la formation et de l'élongation des autophagosomes	35
Tableau 4.	Les effets de l'inactivation ubiquiste chez la souris des protéines ATG	49
Tableau 5.	Les effets de l'inactivation spécifique de l'autophagie dans certains organes	49
Tableau 6.	Les maladies humaines associées à des défauts d'autophagie	58
Tableau 7.	Les doubles rôles des protéines autophagiques et apoptotiques	63
Tableau 8.	Les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des récepteurs purinergiques	69
Tableau 9.	Fréquences des principaux gènes retrouvés mutés dans les cas de LMMC	77

INTRODUCTION

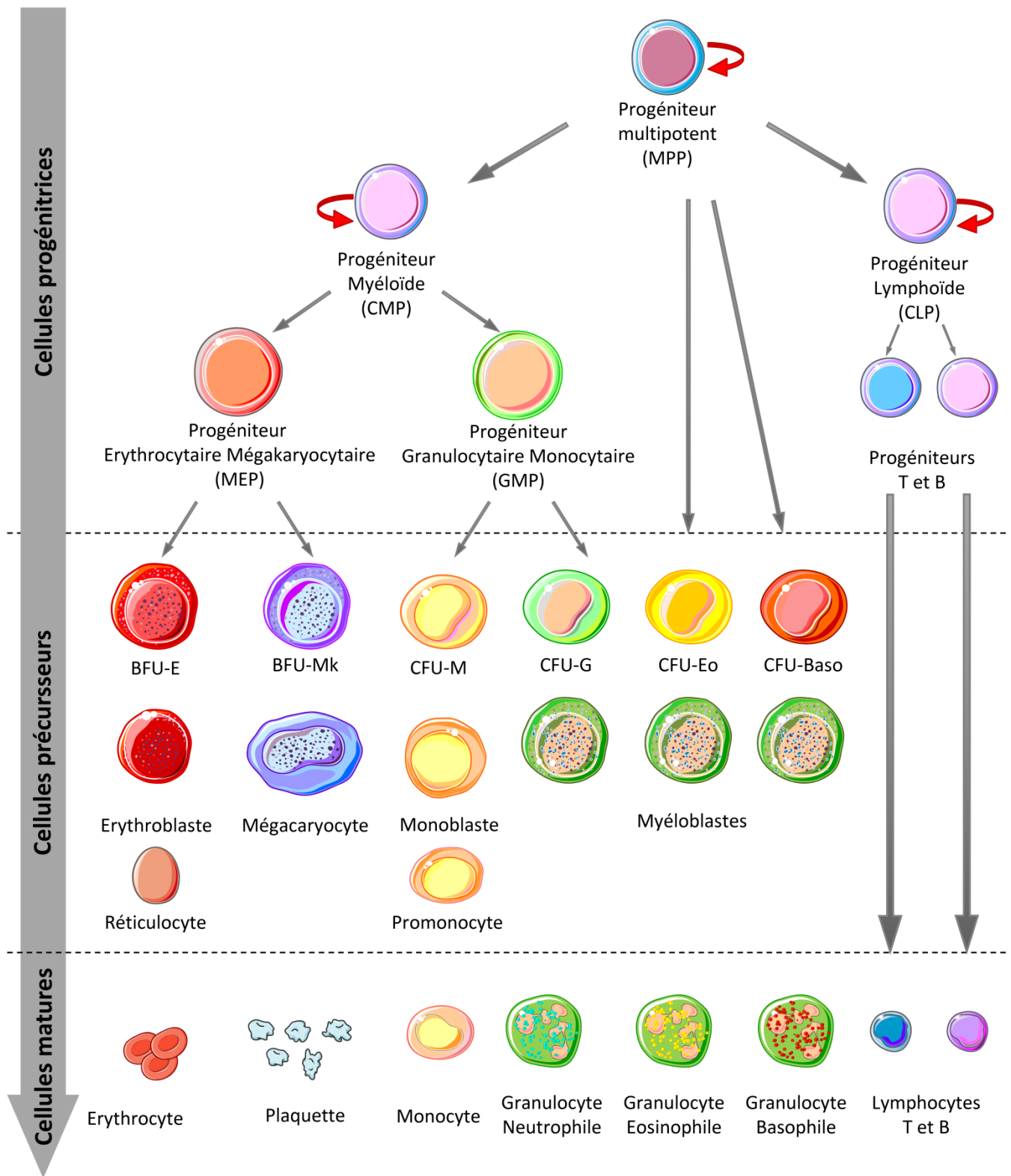


Figure 1: L'Hématopoïèse. L'hématopoïèse est un processus cellulaire hautement régulé qui permet le renouvellement des cellules sanguines matures à partir d'un nombre restreint de progéniteurs hématopoïétiques qui sont capables d'auto-renouvellement (flèches rouges).

MPP: Multipotent Progenitor, **CMP:** Common Myeloid Progenitor, **MEP:** Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors, **GMP:** Granulocyte/Macrophage progenitors, **CLP:** Common Lymphoid Progenitor, **BFU-E, Mk:** Burst-Forming Unit Erythrocytes, - Mégakaryocyte. **CFU-G, -M, -Eo, -Baso:** Colony-Forming Unit Granulocyte, -Monocyte, Eosinophile, Basophiles.

INTRODUCTION

I - Des monocytes aux Macrophages

A. L'origine des monocytes

L'hématopoïèse est un processus très régulé qui permet la génération de toutes les cellules présentes dans la circulation sanguine. Elle assure le renouvellement continu des cellules sanguines matures à partir d'un nombre restreint de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (**Figure 1**).

Grâce à l'influence de leur microenvironnement, les précurseurs myéloïdes vont produire toutes les cellules du sang à l'exception des lymphocytes.

Les monocytes dérivent du progéniteur granulomonocytaire (GMP ou GM-CFU pour Colony Forming Unit Granulocytes Macrophage). Ces derniers, en présence de CSF-2 (GM-CSF), de CSF-1 (M-CSF), d'IL-3 ou d'IL-6 deviendront tout d'abord des monoblastes puis des promonocytes et enfin des monocytes. Les monocytes matures quitteront alors la moelle osseuse pour migrer vers la circulation. Ils représentent 5 à 10% des leucocytes présents dans le sang. Une fois dans la circulation sanguine, la demi-vie du monocyte est relativement courte, elle n'est que d'un jour chez la souris et de trois jours chez l'homme. Ce passage furtif dans la lumière du vaisseau sanguin résulte de la rapide migration du monocyte vers les tissus. Durant cette extravasation, le monocyte va se différencier en macrophage ou en cellules dendritiques. Ainsi, les monocytes, en se différenciant en plusieurs types de cellules immunitaires, permettent de maintenir l'homéostasie en adoptant plusieurs rôles dans l'immunité innée et adaptative en cas d'inflammation.

B. Caractérisation et Fonctions des monocytes

Les monocytes possèdent des caractéristiques morphologiques spécifiques comme une forme ronde mais aux contours très irréguliers, un noyau réiniforme et des vésicules cytoplasmiques (Passlick et al., 1989). Leur taille peut varier, ce qui les rend très difficiles à distinguer visuellement d'une cellule dendritique ou d'un lymphocyte activé. Les monocytes

	Monocytes Classiques	Monocytes Intermédiaires	Monocytes Non Classiques
Phénotype	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺
Proportion par rapport à la totalité des monocytes	85%	5%	10%
Principaux marqueurs de surface exprimés	CCR2, CD62L, FCγRI,	CMHII, FCγRII, HLA-DR, Tie2, CX3CR1	CD43, CMHI, CX3CR1
Sécrétions en réponse au LPS	IL-10, CCL2, CCL5, IL-6, IL-8	TNFα, IL-6, IL-8, IL-1β	VEGFα, COX-2, TNFα, IL-1β
Caractéristiques	Pro-inflammatoire, antimicrobien et potentiel phagocytaire	Favorisent la prolifération des LT	Rôle dans la surveillance <i>in situ</i> des tissus

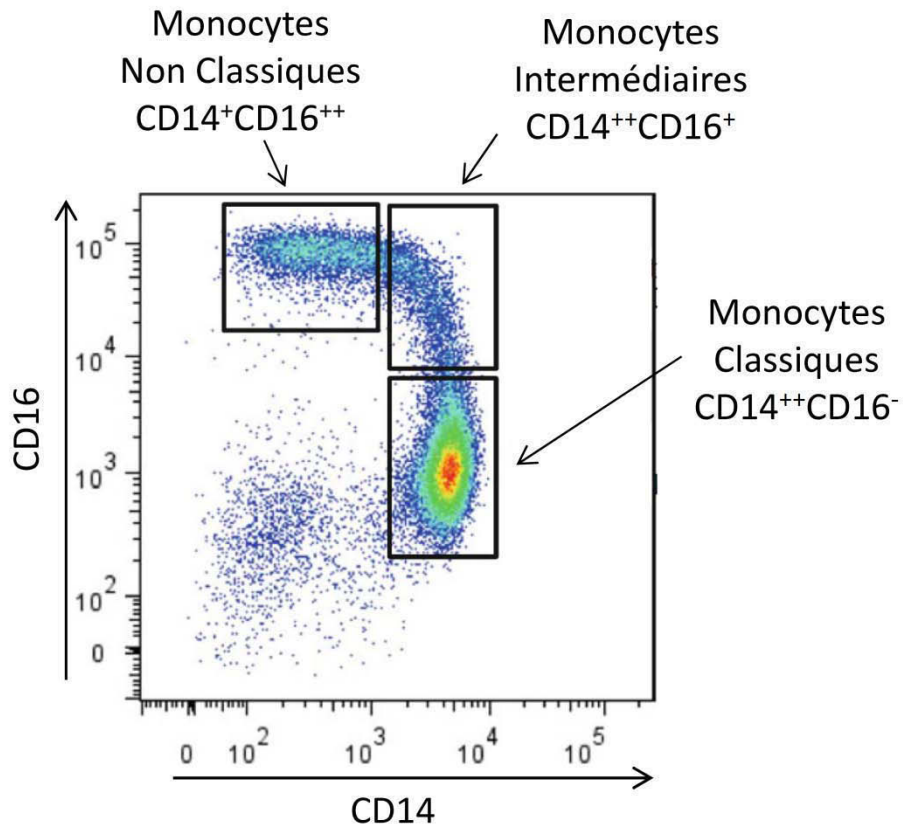
Adapté de Wong *et al.*, 2012 et de Tacke *et al.*, 2006

Tableau 1: L'hétérogénéité des monocytes: Phénotypes et fonctions des différentes sous-populations monocytaires. Tableau récapitulatif des caractéristiques identifiées pour chacune des sous population monocytaires

peuvent être identifiés grâce à l'expression du récepteur du CSF-1 (CSF-1R, M-CSFR ou CD115) et du récepteur CX3CR1 et se distinguent des autres cellules mononuclées du sang par l'absence d'expression des marqueurs membranaires CD3, CD19 et CD15 (Auffray et al., 2009).

Bien qu'il existe plusieurs populations de monocytes, ces derniers possèdent néanmoins des caractéristiques communes. En effet, les monocytes expriment tous de nombreux récepteurs scavangers leur permettant de reconnaître certains lipides et microorganismes. La reconnaissance de ces particules active les monocytes, leur conférant d'une part, la capacité de produire des agents cytotoxiques tels que les ROS, le NO mais également de nombreuses cytokines telles que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-10 ou encore des prostaglandines. D'autre part, les monocytes ont la faculté de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes présents dans la circulation sanguine (Van Furth, 1980; Van Furth et al., 1972). Enfin, une autre caractéristique des monocytes est leur capacité à présenter à leur surface des peptides antigéniques. Toutefois, l'efficacité de cette exposition est bien plus faible que celle des cellules présentatrices d'antigènes « professionnelles » (CPA) telles que les cellules dendritiques.

Initialement, les monocytes ont été identifiés grâce à leur forte expression du marqueur membranaire CD14 (Récepteur aux lipopolysaccharides) (Ziegler-Heitbrock and Ulevitch, 1993). Cependant il n'est pas le seul, puisque l'expression d'autres marqueurs diffère au sein des monocytes circulants, apportant la preuve qu'il existe plusieurs catégories de monocytes. (**Figure 2**). Ainsi, les niveaux variables d'expression du CD14 mais aussi du CD16 (FC γ RIII) (Ziegler-Heitbrock et al., 1993) ont permis d'identifier trois populations de monocytes : les monocytes dits classiques CD14⁺⁺CD16⁻ qui représentent 85% de la population monocytaire, les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ et les non-classiques CD14⁺CD16⁺⁺, représentant respectivement 5 et 10% des monocytes circulants (Ziegler-Heitbrock, 2007). Ces populations diffèrent à bien des égards, notamment au niveau de leur capacité migratoire (Geissmann et al., 2003), de l'expression de molécules d'adhésions, et de récepteurs aux chimiokines (CCR) (Frankenberger et al., 1996). Les monocytes dits « classiques » expriment le CCR2, le CD62L (L-selectine) et le CD64 (FC γ RI) alors que les monocytes intermédiaires et non classiques n'expriment pas le CCR2 mais possèdent des niveaux élevés de CMHII et de FC γ RII les rendant plus aptes à la présentation d'antigènes



Adapté de Wong *et al.*, 2012

Figure 2: L'hétérogénéité des monocytes : L'identification de sous-populations monocytaires. Profil obtenu en cytométrie en flux, représentant les différentes populations de monocytes présentes dans le sang d'un sujet sain. L'analyse de l'expression du CD14 et CD16 a été effectuée sur l'ensemble des cellules mononucléées du sang obtenues après ficoll. Les monocytes classiques expriment fortement le CD14 mais pas le CD16, (cadran inférieur droit), les monocytes intermédiaires expriment fortement le CD14 et faiblement le CD16 (cadran supérieur droit) enfin, les monocytes non classiques expriment faiblement le CD14 mais présentent de fort niveau d'expression de CD16 (cadran supérieur gauche).

(Gordon and Taylor, 2005; Tacke and Randolph, 2006) (**Tableau 1**). Il est important de noter qu'au sein de la population minoritaire des monocytes CD16⁺, il existe aussi une grande hétérogénéité. Ainsi, à la suite d'une stimulation au LPS, les monocytes exprimant le CD16⁺ produisent plus de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-1 β comparativement aux monocytes CD16⁻ dit « classiques ». (Belge et al., 2002; Wong et al.). L'intérêt grandissant pour cette population s'explique par le fait que la quantité de monocytes CD16⁺ augmentent au détriment des monocytes classiques dans le sang lors de conditions inflammatoires, comme l'artériosclérose (Schlitt et al., 2004), l'asthme (Moniuszko et al., 2009), l'arthrite rhumatoïde (Baeten et al., 2000; Cooper et al.) ou encore dans certains carcinomes ou cancers colorectaux (Saleh et al., 1995; Schauer et al.).

C. La différenciation du monocyte en macrophage

Les monocytes circulants migrent au niveau des sites inflammatoires avec comme principal objectif d'éliminer les pathogènes et de contribuer à la réparation tissulaire. En condition inflammatoire, les tissus vont sécréter de nombreuses cytokines et chimiokines afin de recruter le système immunitaire et d'induire une réponse inflammatoire.

Le recrutement spécifique des monocytes est permis grâce à une chimio-attraction médiée principalement par les chimiokines MCP-1 (CCL2) et MCP-3 (CCL7) (Monocyte Chemotactic Protein 1, 3), qui sont reconnues par le CCR2, un récepteur très fortement exprimé à la surface des monocytes. Cette reconnaissance va initier les mécanismes d'adhésions cellulaires entre les monocytes circulants et les cellules endothéliales des vaisseaux, qui seront suivis par la migration des monocytes vers le site inflammatoire. Cette migration peut être subdivisée en plusieurs étapes, à l'issue desquelles, le monocyte sera différencié en macrophage (Imhof and Aurrand-Lions, 2004).

1. La migration vers les tissus

La migration de la lumière du vaisseau sanguin vers les tissus endommagés fait intervenir une série d'interactions moléculaires entre les monocytes et les cellules endothéliales. Les selectines sont des protéines de surface qui interagissent avec des glyco-protéines, permettant ainsi aux monocytes de se lier aux cellules endothéliales ce qui va initier la

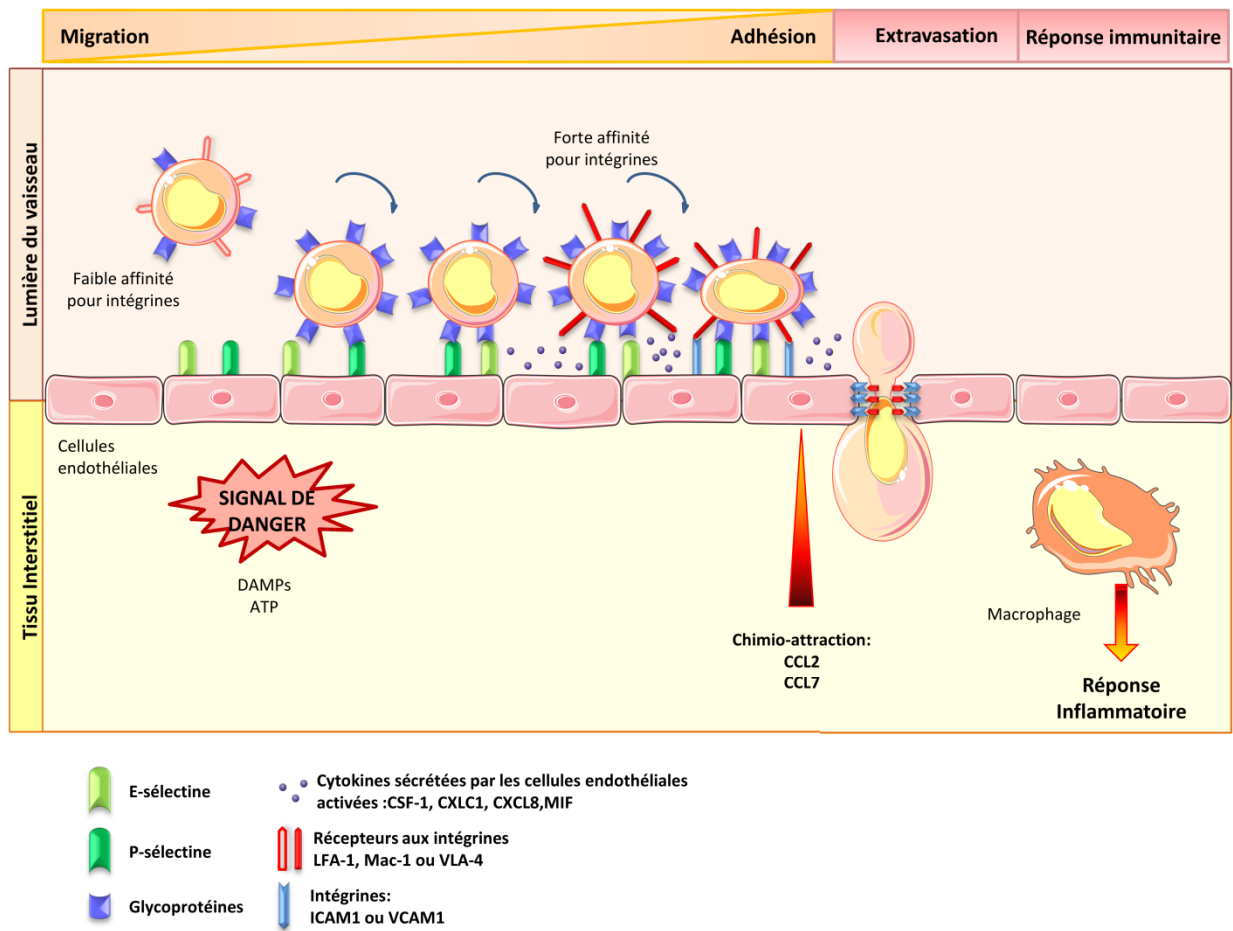


Figure 3: L'Extravasation du monocyte: En réponse à divers stimuli (signaux de danger ou chimioattractants), les monocytes quittent la circulation sanguine pour migrer vers les sites inflammatoires. L'étape initiale de ce processus est la phase de «rooling » au cours de laquelle, les glycoprotéines présentes à la surface du monocytes vont reconnaitre les E-sélectines et P-sélectines exprimées au niveau des cellules endothéliales activées, ce qui aboutit au ralentissement de la course du monocyte. Commence alors la deuxième étape, où les cytokines sécrétées par les cellules endothéliales notamment le CSF-1, permettent d'augmenter très fortement l'affinité du monocyte pour les intégrines (ICAM1 et VCAM1) exprimées à la surface des cellules endothéliales, la course du monocyte dans le sang est alors stoppée. Enfin au cours de la troisième étape, le monocyte quitte la circulation sanguine *via* les jonctions cellulaires et entame ainsi sa migration vers les tissus endommagés. A l'issue de cette étape, le monocyte sera différencié en macrophage où jouera son rôle dans la réponse inflammatoire.

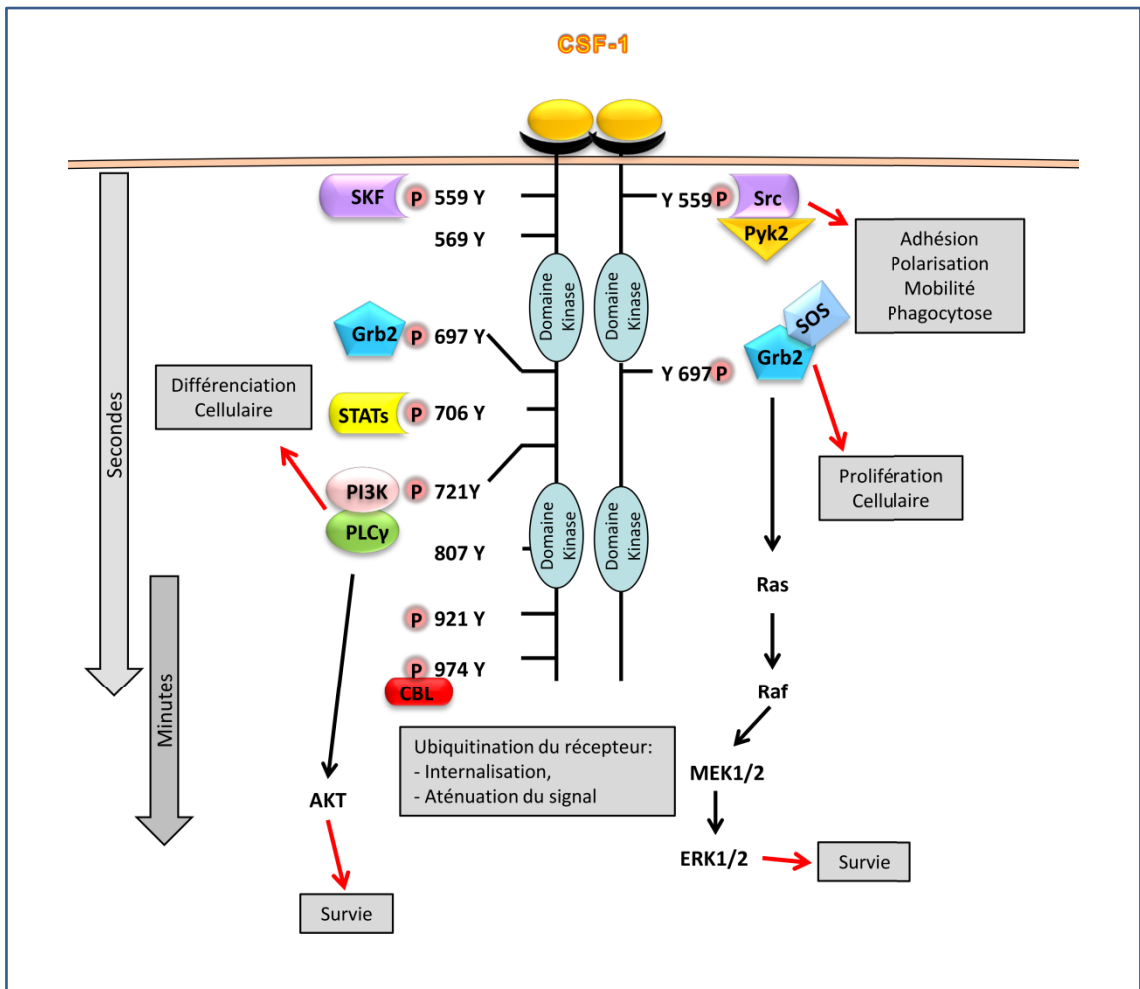
cascade d'activation d'adhésion (**Figure 3**). Initialement, cette liaison est de faible affinité mais celle-ci va se renforcer grâce à l'augmentation de l'expression de différentes molécules d'adhésion à la surface du monocyte. En effet, le monocyte va exprimer de plus en plus de récepteurs aux intégrines telles que LFA-1, Mac-1 ou VLA-4 qui vont reconnaître, au niveau des cellules endothéliales activées, leur ligands ICAM1 et VCAM1. Ces interactions de plus en plus fortes entre les cellules endothéliales et les monocytes, vont ralentir la « course » de ces derniers jusqu'à les stopper, la phase dite d'extravasation commence alors (Nourshargh and Alon). En effet, l'interaction avec les monocytes va induire au sein des cellules endothéliales des remaniements de leur cytosquelette ce qui va conduire à l'ouverture des jonctions cellulaires du vaisseau sanguin. Grâce à cette adhésion le monocyte va migrer au travers des jonctions épithéliales pour atteindre les tissus.

Parallèlement au remaniement de leur cytosquelette, les cellules endothéliales vont sécréter de nombreuses cytokines dont le colony stimulating factor-1 (CSF-1). En effet, un des premiers producteurs de CSF-1 présent dans la circulation sanguine sont les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins. Or, le CSF-1 est la cytokine clé qui permet d'induire la différenciation du monocyte en macrophage. En effet, le CSF-1 en se liant à son récepteur, va permettre son autophosphorylation induisant de nombreuses cascades de signalisation responsables de la différenciation macrophagique du monocyte.

2. Le récepteur au CSF-1

a. Généralités sur le CSF-1R

La glycoprotéine CSF-1, aussi connue sous le nom de macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), est un facteur de croissance régulant la survie, la prolifération et la différenciation des macrophages (Stanley et al., 1978). Le CSF-1 se lie avec une très forte affinité à son récepteur le CSF-1R, un récepteur à activité tyrosine Kinase (Yeung et al., 1987). Celui-ci est faiblement exprimé au niveau des cellules souches hématopoïétiques. En revanche son expression est élevée à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules microgliales et sa stimulation par du CSF-1 contribue au développement de ces cellules. Bien que le CSF-1R soit le seul récepteur du CSF-1, un autre ligand alternatif au CSF-1R, nommé IL-34, a récemment été identifié. L'IL-34 peut également



Adapté de Dey *et al.*, 2000 et de Pixley *et al.*, 2004

Figure 4: Les voies de signalisation régulées par colony-stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) dans les cellules myéloïdes. La liaison de colony-stimulating factor-1 (CSF-1) stabilise une forme dimérique du CSF-1R ce qui induit l'autophosphorylation des résidus tyrosine (représentés par les ronds rose) du récepteur. Une fois phosphorylées, ces tyrosines deviennent des sites de recrutement de molécules de signalisation notamment impliquées dans la prolifération, la survie ou encore la différenciation cellulaire.

se lier également à un autre récepteur porteur d'une activité tyrosine phosphatase, le récepteur PTP- ζ (receptor-like protein-tyrosine phosphatase zéta) (Nandi et al.).

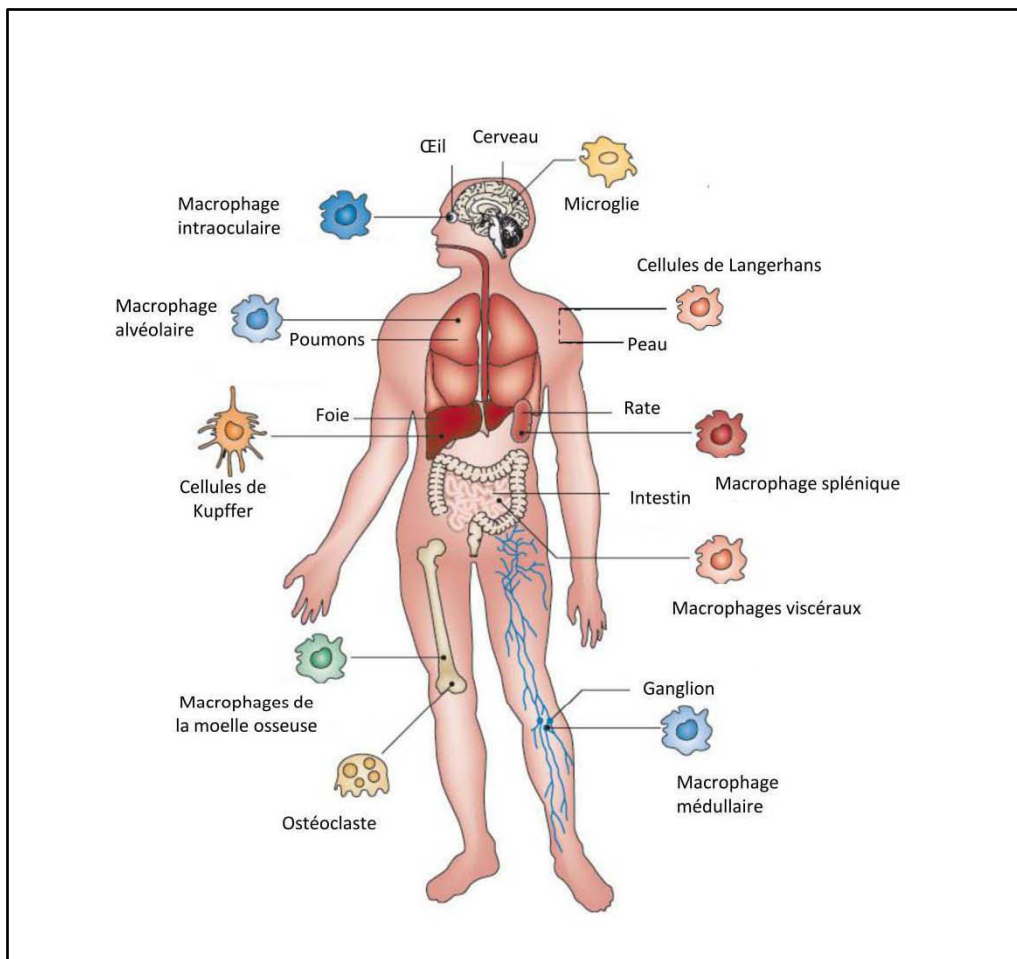
L'IL34 et le CSF-1 possèdent des activités biologiques comparables. Les différences observées sont la conséquence d'une expression et d'une régulation spatio-temporelle différentes entre ces cytokines. Par ailleurs, alors que le CSF-1 est présent à de faibles concentrations dans le plasma d'individus sains, l'IL34 n'est pas détectable. Ainsi, l'action de l'IL-34, à l'inverse du CSF-1 est limitée au niveau du microenvironnement proche de son lieu de sécrétion (Nandi et al.). Enfin, ces deux cytokines jouent des rôles complémentaires dans le développement, le maintien et l'activité des macrophages (Wei et al.).

L'activation du CSF-1R par le CSF-1 induit sa dimérisation et l'auto-phosphorylation de plusieurs de ses résidus tyrosines intracellulaires conduisant à l'initiation de cascades de signalisation phosphorylantes. Celles-ci vont activer un large spectre de réponses intracellulaires. La phosphorylation du CSF-1R est rapidement suivie par l'internalisation du récepteur avec son ligand au sein de corps multi-vésiculaires qui sont dirigés vers le lysosome pour y être dégradés. (Lee et al., 1999)

b. Les voies de signalisation activées par le CSF-1R

Plusieurs études ont démontré l'importance des phosphorylations intracellulaires des résidus tyrosines du CSF-1R. Ces tyrosines sont essentielles pour l'interaction avec les molécules adaptatrices responsables de l'activation de plusieurs voies de signalisation. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine Y697 est responsable du recrutement des protéines adaptatrices Grb2-SOS qui permettent l'activation de la voie MAPK/ERK (Kolch, 2005), (Lewis et al., 1998). La phosphorylation de la tyrosine Y721 permet l'activation de la voie PI3K/AKT. Une fois activée, la voie PI3K/AKT est responsable de la fixation au CSF-1R de la PLC γ 2 et de son activation (Bourette et al., 1997; Van der Geer and Hunter, 1991) (**Figure 4**).

Lors de la différenciation macrophagique du monocyte, la stimulation du CSF-1R permet l'activation quasi instantanée des voies de signalisation PI3K/AKT et Erk1/2. En effet, dans les monocytes, et ceci dans les premières minutes de stimulation du CSF-1R, les vagues de phosphorylations et de déphosphorylations de la tyrosine Y721 sont corrélées aux vagues successives d'activation d'AKT, dont l'amplitude et la durée augmentent après la stimulation. Cette régulation oscillatoire d'AKT est cruciale puisqu'elle est requise pour l'activation des caspases qui induisent le clivage d'un certain nombre de substrats tel que NPM (Guery et al.),



Adapté de Murray *et al.*, 2011

Figure 5: Les macrophages et leur localisation tissulaire. Les précurseurs macrophagiques quittent la moelle osseuse sous forme de monocytes, qui migrent rapidement dans les tissus pour se différencier en macrophages dont leur appellation diffère en fonction des tissus. Ils assureront alors, l'immunosurveillance tissulaire notamment en phagocytant les débris et les pathogènes, en attirant d'autres cellules immunitaires et enfin en sécrétant des cytokines régulant la réponse immunitaire.

puis la différenciation du monocyte en macrophage (*cf.* Partie II-A.2.b2.2) (Jacquel et al., 2009). Parallèlement, la voie Erk1/2 est activée avec une cinétique semblable à celle d'AKT, mais bien qu'essentielle à la différenciation macrophagique, elle n'intervient pas dans l'activation des caspases et son rôle précis dans le processus de différenciation reste encore à définir. Par ailleurs, Bourette *et al.* (Bourette et al., 1997) ainsi que Bourgin-Hierle *et al.* (Bourgin-Hierle et al., 2008) ont démontré que l'activation rapide et transitoire de la PLC γ 2 est également nécessaire à la différenciation macrophagique.

Enfin, il est intéressant de noter, que la quasi-totalité des voies de signalisation activées en réponse au CSF-1 sont nécessaires à la différenciation du monocyte en macrophage. En effet, leur inhibition (par une approche utilisant des siRNA) ou leur altération (utilisation de mutants constitutifs actifs) bloquent l'induction de ce processus.

3. Les macrophages

La stimulation du CSF-1R au cours de l'extravasation du monocyte aboutit à l'activation de nombreuses voies de signalisation responsables de l'induction des processus majeurs de la différenciation macrophagique et notamment à l'activation des caspases. Ainsi, à l'issue de sa migration, le monocyte sera différencié en une autre cellule de l'immunité innée, le macrophage.

Les macrophages présents dans les tissus ont pour fonction de maintenir l'homéostasie tissulaire *via* l'élimination des cellules sénescents, la reconstitution et la réparation des tissus endommagés. Les macrophages sont des cellules immunitaires très hétérogènes. Cette hétérogénéité est dû au fait que le macrophage adopte une fonction spécifique suivant sa localisation tissulaire (Gordon and Taylor, 2005). Ainsi, en fonction du tissu où ils se trouvent, les macrophages sont nommés différemment et présentent des morphologies différentes (**Figure 5**).

Ils sont présents dans tout l'organisme, dans le foie (cellules de Kupffer), dans les poumons (macrophages alvéolaires), dans les os, au niveau des tissus conjonctifs (ostéoclastes et chondroclastes), dans la peau (cellules de Langerhans) ou encore au niveau du système nerveux central (microglie) (Davies et al.) (Martinez et al., 2008).

Quelle que soit leur localisation, les macrophages sont des cellules immunitaires qui jouent un rôle indispensable dans l'homéostasie et la défense tissulaire. Ils peuvent ainsi être polarisés et mettre en place des réponses spécifiques en fonction de leur environnement

Tissus	Type cellulaire	Fonctions
Sang	Monocytes	Assurent la phagocytose des débris de cellules endothéliales et l'élimination des pathogènes circulants
Os	Ostéoclastes	Cellules polynuclées responsables de la résorption du tissu osseux (destruction de la matrice minéralisée de l'os)
Os	Macrophages de la moelle osseuse	Support de l'érythropoïèse et maintien des cellules souches hématopoïétiques dans la niche
Système nerveux central	Microglie	Responsables de la surveillance immunitaire, de la suppression des neurones morts et du remodelage synaptique
Foie	Cellules de Kupffer	Elimination des microorganismes, des toxines, des débris cellulaires du sang, et des érythrocytes
Poumon	Macrophages alvéolaires	Surveillance immunitaire, élimination des pathogènes, poussières ou microorganismes inhalés. Régulation de l'homéostasie tissulaire <i>via</i> élimination du surfactant
Tissus viscéraux	Macrophages péritonéaux/intestinaux	Surveillance immunitaire et régulation de l'homéostasie environnementale ; élimination des cellules apoptotiques
Peau	Cellules de Langerhans	Interaction avec les lymphocytes T
Rate	Macrophages	Elimination des érythrocytes vieillissants

Adapté de Davies *et al.*, 2013

Tableau 2: Fonctions des macrophages tissulaires. Ce tableau résume les différentes appellations et propriétés des macrophages en fonction de leur localisation tissulaire.

(Tableau 2). Les macrophages polarisés peuvent être classifiés en 2 groupes : les macrophages de type M1, lesquels sont notamment activés par l'IFN γ et le LPS et les macrophages de type M2 qui sont eux essentiellement activés après une stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13

Les M1 ont une très forte activité bactéricide alors que les M2 ont un rôle dans la diminution de l'inflammation grâce à une forte activité phagocytaire et à la synthèse de facteurs trophiques, le tout associé à une sécrétion réduite de cytokines pro-inflammatoires.

Cette notion de macrophages de type M1 et M2 n'est que très récente et n'est nommée ainsi qu'en reflet de la nomenclature déjà existante au niveau des cellules CD4⁺ Th1 et Th2. En effet, les cellules Th1 sont caractérisées par la sécrétion d'IFN γ qui permet d'augmenter la présentation des peptides antigéniques, la synthèse de cytokines inflammatoires ainsi que le potentiel phagocytaire des macrophages, alors que les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 ce qui conduit à une réponse immunitaire humorale

a. La polarisation pro-inflammatoire (macrophages de type M1)

Les macrophages de type M1 se polarisent en réponse à la stimulation concomitante d'IFN γ et d'agents microbiens comme le LPS (Adams, 1989). L'IFN γ est principalement sécrété par les cellules Th1, les CD8⁺, les Natural Killers et les cellules présentatrices d'antigènes. En réponse au LPS, les macrophages vont s'activer et sécréter une forte quantité de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-15, l'IL-18, le TNF α , et l'IL-12. Ils peuvent aussi sécréter les chimiokines nécessaires au recrutement des cellules Th1, des neutrophiles et des Natural Killers, telles que le CCL15, le CCL20, le CXCL13, le CXCL9, le CXCL10, et CXCL11 permettant ainsi l'amplification de la réponse inflammatoire (Guha and Mackman, 2001; Mantovani et al., 2004).

De plus, les macrophages de type M1 expriment fortement le CMHII ainsi que des molécules de co-stimulation telles que le CD80 et le CD86 alors qu'ils n'expriment que faiblement le CD206 et le FCyRII (CD32) (Boehm et al., 1997).

L'activité bactéricide est permise grâce à différents mécanismes incluant l'acidification des phagosomes et la synthèse de réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROI). Par ailleurs ces macrophages expriment des niveaux élevés d'iNOS (Isoforme de la NO Synthase inducible dans les macrophages) induite spécifiquement par l'IFN γ dans les macrophages. Celle-ci

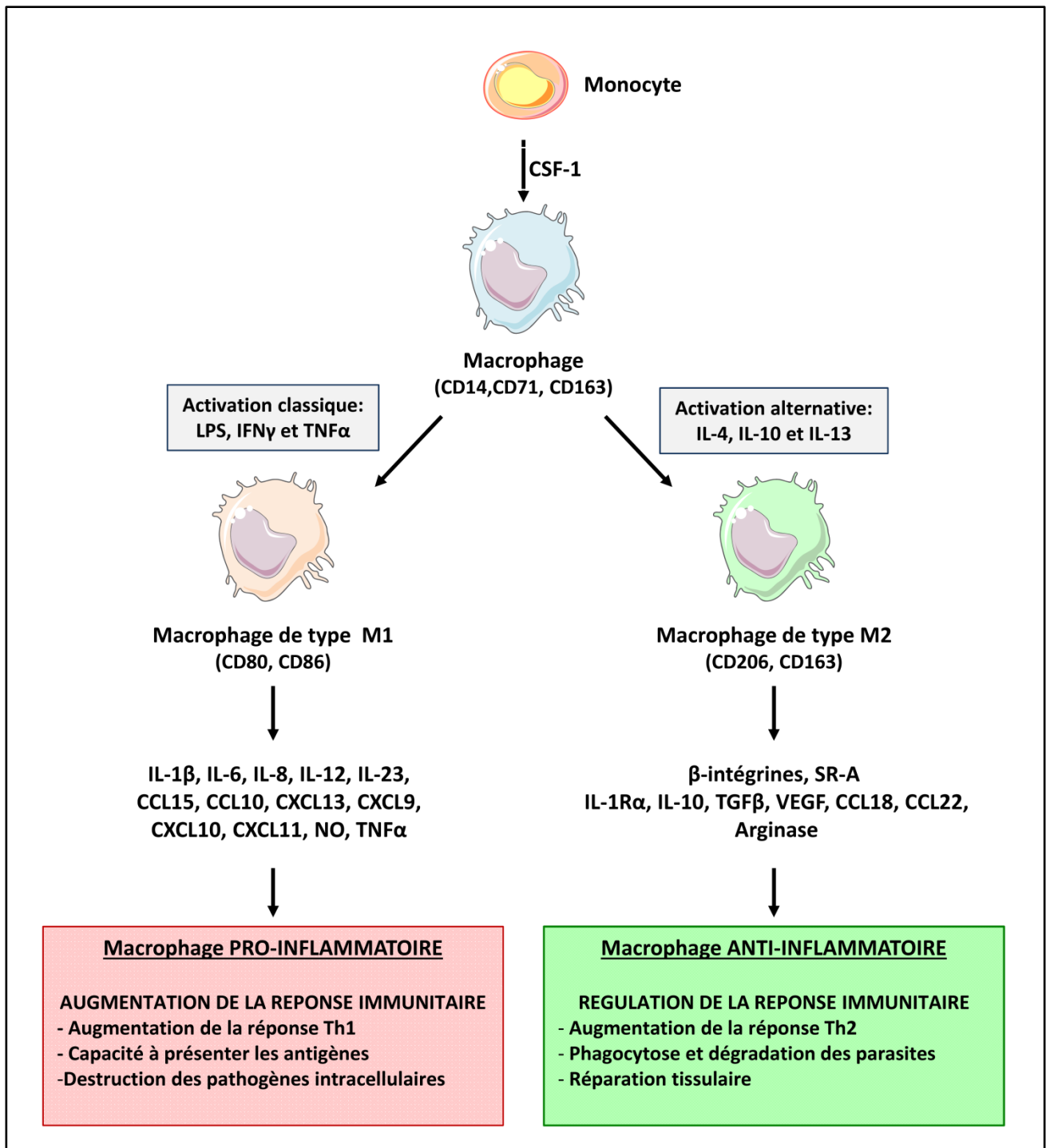


Figure 6: La polarisation macrophagique. La stimulation du monocyte par du CSF-1 permet d'induire sa différenciation en macrophage. En présence de LPS et d'IFN γ ce macrophage se polarise en macrophage pro-inflammatoire (macrophage de type M1). Les M1 vont sécréter un ensemble de cytokines qui vont être responsables de l'augmentation du recrutement de nombreuses cellules immunitaires sur le lieu d'infection. Les macrophages de types M2, obtenus grâce à une stimulation par de l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13 sont considérés comme anti-inflammatoires et sont impliqués dans la réparation des tissus et la phagocytose des débris cellulaires.

permet la conversion de la L-arginine en L-citruline et en NO, un radical libre très toxique pour les bactéries (MacMicking et al., 1997) (**Figure 6**).

b. La polarisation anti-inflammatoire (macrophages de type M2)

Les macrophages de type M2 jouent eux aussi un rôle crucial dans l'inflammation. Mais à l'inverse des M1 qui sont très actifs dans la lutte antibactérienne, les M2 sont impliqués dans la phase de réparation tissulaire et jouent un rôle dans l'étape terminale de l'inflammation. Les macrophages de type M2 sont obtenus suite à leur stimulation par de l'IL-4 ou de l'IL-13, interleukines principalement produites par les cellules Th2 et les basophiles (Stein et al., 1992). L'IL-4 peut se lier à deux récepteurs, l'IL4R α et l'IL-2R. Quant à l'IL-13, il peut interagir avec trois récepteurs l'IL-13R α 1, l'IL-13R α 2 et un hétérocomplexe formé par l'IL-13R α 1 et l'IL-4R α 1 (Mueller et al., 2002). L'action biologique de l'IL-4 et de l'IL-13 sur les macrophages a longtemps été considérée comme principalement anti-inflammatoire car associée à la diminution de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le GM-CSF, l'IFN γ , le CCL2/MCP-1 et la baisse de production d'anions superoxydes. Cependant, la stimulation des macrophages par de l'IL-4 n'induit pas seulement la diminution des cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'IL-4 induit la sécrétion des chimiokines CCL22 et CCL18 et de cytokine telles que l'IL-1R α et le VEGF et permet également l'augmentation de l'expression du CMH-II, des β -ainsi que l'expression de récepteurs scavangers tels que le SR-A, ou encore le récepteur au mannose, le CD206 (MRC1) à la surface du macrophage. L'ensemble de ces molécules a pour effet d'augmenter le potentiel phagocytaire du macrophage et de favoriser la cicatrisation tissulaire (Mantovani et al., 2002; Wang et al., 1998) (**Figure 6**).

Enfin, au niveau de l'expression de certains marqueurs enzymatiques spécifiques, les M2 présentent des niveaux élevés d'arginase-1. Cette enzyme permet le catabolisme de la L-arginine en L-ornithine, un précurseur de polyamines et de la proline, molécule nécessaire à la reconstruction matricielle et à la prolifération cellulaire (Hesse et al., 2001; Modolell et al., 1995). Ainsi, en plus de leur faculté à diminuer l'inflammation et à éliminer les débris cellulaires, les M2 permettent la cicatrisation tissulaire et la prolifération cellulaire au sein du tissu. (Torocsik et al., 2005).

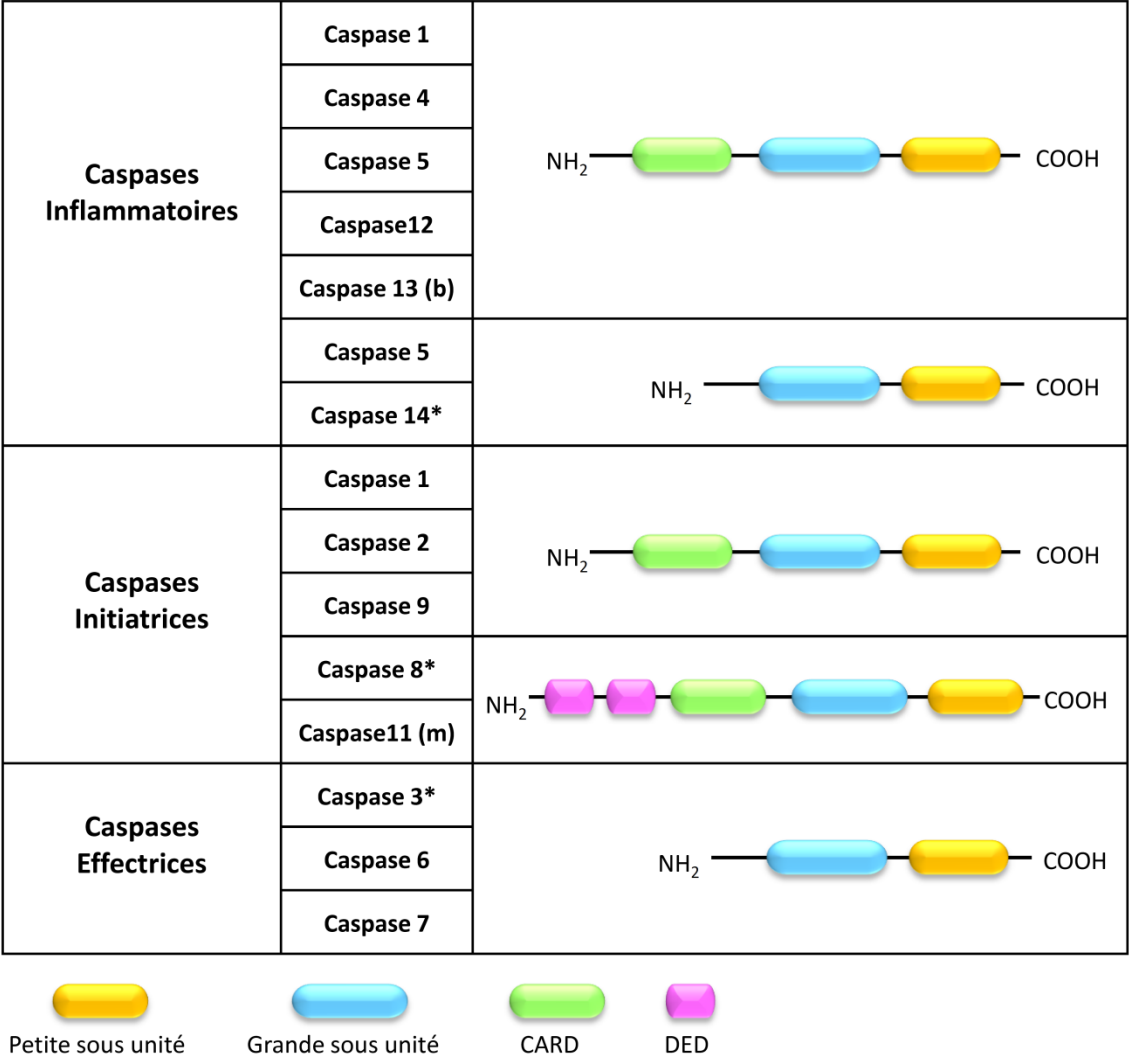


Figure 7: Les Caspases, Protéases à cystéine. En fonction de leur fonction les caspases peuvent être divisées en 3 catégories : les Caspases inflammatoires, les Caspases initiatrices, et les caspases effectrices. Les (*) représentent les caspases déjà décrites comme nécessaires aux processus de différenciation. (m): Caspase exprimée uniquement chez la souris, (b): Caspase exprimée uniquement chez les bovins.

II - Caspases et Autophagie dans les processus cellulaires

A. Les Caspases

1. Définition

Les caspases (Cystéine ASpartate protéASES) sont des protéases à cystéine qui présentent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartate (D).

A ce jour, dix-huit caspases sont référencées chez les mammifères (Eckhart et al., 2008).

Il est à noter que la caspase 5 n'est pas exprimée chez la souris et que les caspases 11 et 13 sont respectivement les orthologues murin et bovin de la caspase 4 humaine (Eckhart et al., 2008), (McIlwain et al.).

Les caspases de mammifères 2, 3, 7, 8, 9 et 10 sont dites apoptotiques alors que les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 sont impliquées dans l'inflammation. La caspase 14 est exprimée dans l'épiderme et a un rôle dans la cornification durant la différenciation terminale des kératinocytes permettant ainsi la formation de la couche cornée (Denecker et al., 2008), (Eckhart et al., 2000) (**Figure 7**).

Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs et possèdent, une fois activées, une spécificité stricte de clivage de leurs substrats du côté carboxy-terminal d'un résidu aspartate. Les caspases peuvent s'auto-activer et/ou être activées par d'autres caspases, d'où la notion de cascade d'activation des caspases. Des caspases dites inductrices (comme les procaspases 1, 2, 8, 9 et 10) activent par clivage les caspases dites effectrices (comme les procaspases 3, 6, et 7), qui elles même sont capables de cliver un certain nombre de protéines intracellulaires (environ 800 substrats identifiés). Les caspases initiatrices peuvent également être actives sans être clivées. Le recrutement de ces procaspases dans des complexes multimoléculaires induit une proximité qui permet la dimérisation des zymogènes, puis l'activation de leur domaine catalytique.

2. Implication et rôles physiologiques

a. *La mort cellulaire programmée : Apoptose*

L'apoptose est un processus biologique génétiquement programmé qui assure l'élimination des cellules surnuméraires ou potentiellement dangereuses chez les organismes supérieurs. Ce mécanisme de mort cellulaire, nécessaire à la sculpture des organes au cours du



- La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs spécialisés : les récepteurs de mort. En présence de leur ligand, ces récepteurs vont s'oligomériser et recruter par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), les pro-caspases initiateuses 8 et 10. La formation de ce complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex) induit l'auto-activation de ces caspases qui vont à leur tour activer les caspases effectrices. Le clivage du membre pro-apoptotique Bid par la caspase 8, t-Bid, permet l'activation de la voie intrinsèque et constitue un lien entre ces deux voies.

développement embryonnaire puis de l'homéostasie tissulaire, est très conservé. De nombreux stimuli tels que l'activation des récepteurs à domaine de mort, les rayonnements ultraviolet, le stress métabolique, les agents cytotoxiques et certaines hormones peuvent induire l'apoptose des cellules eucaryotes normales ou transformées, au moins *in vitro*. Une caractéristique fondamentale du processus apoptotique est l'activation d'une famille très conservée de protéases à cystéine, les caspases. La mort cellulaire programmée peut être induite par deux voies principales d'activation des caspases : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (**Figure 8**).

a1. La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque est centralisée au niveau de la mitochondrie et est activée par de nombreux stimuli pro-apoptotiques. Ces signaux incluent, entre autres, les dommages à l'ADN, les agents chimio-thérapeutiques et la privation en facteurs de croissance.

L'étape initiatrice de l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque est la perméabilisation de la membrane mitochondriale ce qui entraîne la mort de la cellule *via* :

- Le relargage dans le cytoplasme de protéines contenues dans l'espace inter-membranaire mitochondrial impliquées dans l'activation des caspases, telles que le cytochrome C, smac, ou Omi
- La perte de la respiration mitochondriale qui s'accompagne d'un arrêt de la production d'ATP vital pour la survie cellulaire.

Ces premières étapes de l'apoptose mitochondriale sont placées sous le contrôle des protéines membres de la famille de Bcl-2. Ces dernières sont classées en trois grands groupes en fonction du nombre de domaine BH (Bcl-2 Homology) (**Figure 9**) :

- les membres anti-apoptotiques, possédant quatre domaines BH (BH1 à BH4) tels que Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl-B,
- les membres pro-apoptotiques sont divisés en deux classes, ceux possédant trois domaines BH (BH1 à BH3) tels que comme Bax, Bak et Bok ; et ceux possédant un domaine BH3 unique comprenant Bad, Bid, Bim, Puma et Noxa.

Membres Anti-Apoptotiques	Possédants 4 domaines BH	Bcl-2	
		Bcl-xL	
		Bcl-W	
		Bcl-B	
		Mcl-1	
Membres Pro-Apoptotiques	Possédants 3 domaines BH	Bax	
		Bak	
		Bok	
	Possédants 1 domaine BH3-only	Bad	
		Bid	
		Puma	
		Noxa	
		Bik	
		Bim	

Figure 9: Les membres de la famille Bcl-2. Cette famille comprend une vingtaine de membres caractérisés par des séquences particulières nommées domaines BH (Bcl-2 Homology). Il existe quatre domaines BH différents ce qui permet de classer les membres de cette famille en trois grands groupes selon leur fonction pro- ou anti-apoptotique. La majorité d’entre eux possèdent dans leur domaine C-terminal, un domaine transmembranaire (TM) qui assure leur ancrage au niveau notamment de la membrane mitochondriale externe.

Les membres de la famille Bcl-2 sont capables de former des homodimères ou des hétérodimères. La proportion de dimères pro ou anti apoptotique au sein de la cellule permet de réguler finement la balance entre la mort et la survie cellulaire.

Ainsi, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe résulte de l'oligomérisation des membres pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bok) qui s'insèrent dans la membrane externe entraînant la formation des pores permettant le relargage du cytochrome C.

L'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale aboutit à la formation d'un complexe macro-moléculaire appelé apoptosome, constitué des protéines APAF-1, du cytochrome C de la pro-Caspase 9 et de molécules d'ATP. APAF-1 s'associe au cytochrome C puis se lie à l'ATP et s'oligodimérise. Cette oligodimérisation permet le recrutement de la pro-caspase 9, son autoactivation et finalement enclenche la cascade d'activation des caspases effectrices puis la mort cellulaire *via* le clivage d'un certain nombre de protéines cibles. (Czabotar et al.)

a2. La voie extrinsèque de l'apoptose

La deuxième grande voie régulant l'induction de l'apoptose est celle dépendante des récepteurs de mort.

Ces récepteurs font partie de la super famille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF). Cette famille de récepteur compte 6 membres capables d'activer les caspases : FAS (CD95), TNFR-1, DR-3, DR-6, TRAIL-R1 et TRAIL-R2. Ce sont des protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire riche en cystéines et un domaine intracellulaire permettant les interactions dans le cytoplasme avec des protéines adaptatrices, nommé le Death Domain (DD).

L'apoptose induite par les récepteurs de mort se déroule en trois phases distinctes :

- suite à la liaison de son ligand, le récepteur se trimérise,
- ce qui provoque le recrutement à la membrane plasmique de molécules adaptatrices spécifiques du récepteur telles que FADD ou Apaf-1
- et aboutit à l'activation des caspases.

La liaison du TNF à son récepteur TNF-R1 conduit à son oligomérisation et aboutit au recrutement de protéines adaptatrices ainsi que des procaspases.

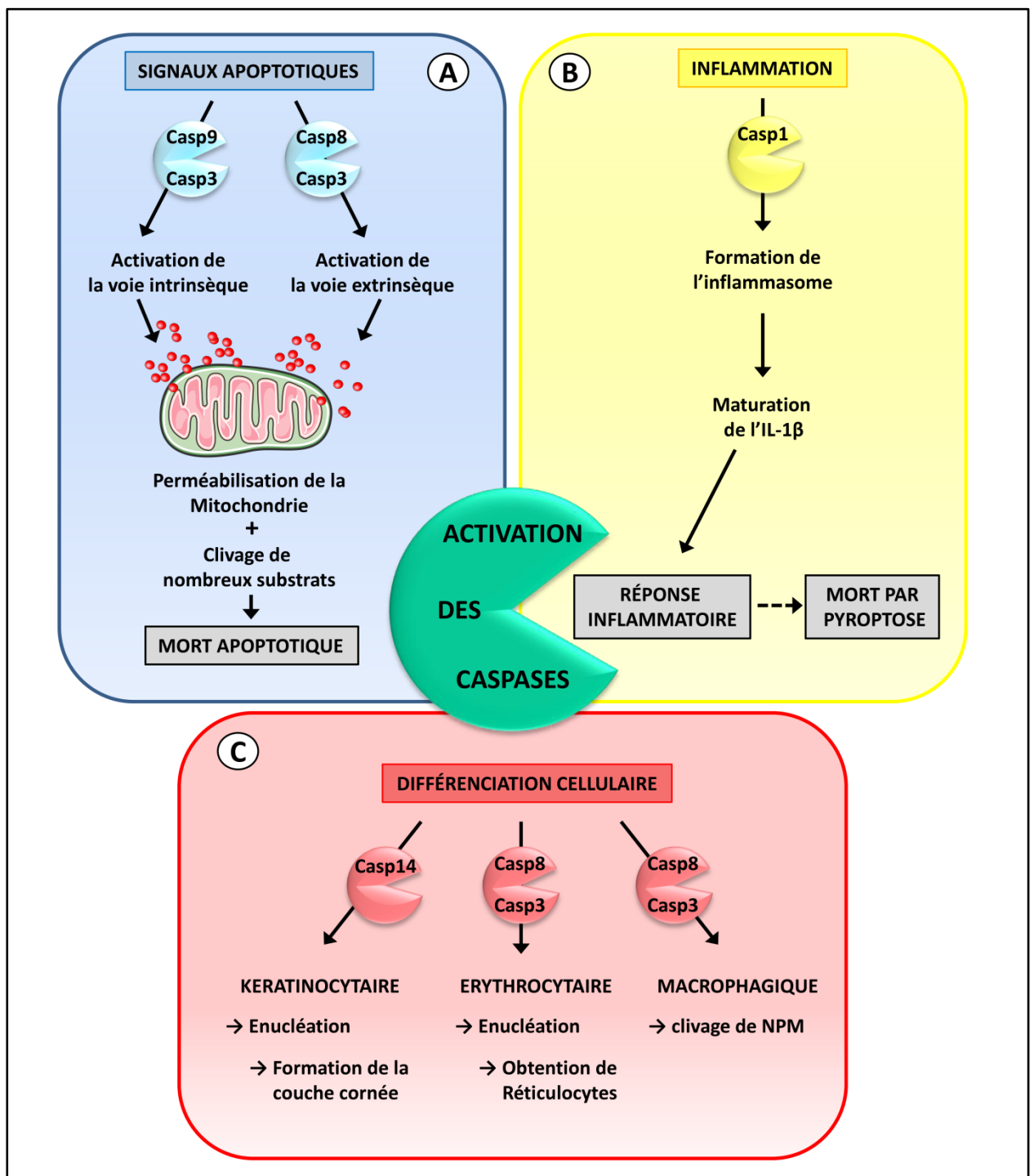


Figure 10: Les différents rôles physiologiques des caspases. Les caspases sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires au cours desquels, elles jouent des rôles différents. **(A)** L'activation des récepteurs de mort ou l'intégration au niveau de la mitochondrie de signaux apoptotiques, vont induire l'activation des caspases (caspase 9, caspase 8 et caspase 3) ce qui induit la perméabilisation mitochondriale ainsi qu'au clivage de nombreux substrats aboutissant ainsi à la mort par apoptose de la cellule. **(B)** L'activation de la caspase 1 est nécessaire à la mise en place de la réponse pro-inflammatoire. En effet elle permet le clivage de la pro-IL-1 β en sa forme mature et fonctionnelle, la cytokine IL-1 β . **(C)** Les caspases sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation cellulaire, notamment au cours de la différenciation kératinocytaire (activation de la caspase 14) et érythrocytaire (activation de la Caspase -8 et de la caspase 3) où elles participent à l'étape terminale de maturation : l'enucléation. Dans le cadre de la différenciation macrophagique, la caspase 8 et la caspase 3 permettent notamment le clivage de NPM.

Ce complexe multimoléculaire appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex), permet le rapprochement des procaspases, qui par leur proximité s'autoactivent pour déclencher la cascade d'activation protéolytique des caspases effectrices.

Les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose aboutissent à l'activation des caspases effectrices. Ces protéases sont responsables du clivage d'un nombre limité de protéines, conduisant à la perte de l'homéostasie cellulaire menant à la mort cellulaire.

Toutefois, l'apoptose n'est pas le seul processus dans lequel les caspases sont impliquées.

b. Fonctions non apoptotiques des Caspases

Depuis plusieurs années, il est devenu évident que le rôle des caspases n'est pas limité à l'apoptose et à leurs implications dans d'autres formes de mort cellulaire (nécrose ou catastrophe mitotique). Ainsi, d'autres fonctions des caspases, indépendantes de leur capacité à induire la mort cellulaire, ont récemment émergé (**Figure.10**)

b1. Caspases et Inflammation

En réponse à la détection de motifs microbiens, les PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) ou à d'autres signaux de danger reconnu par les PRR (Pattern Recognition Receptor), la cellule met en place une réponse inflammatoire. Celle-ci débute par la formation de complexes macromoléculaires distincts nommés inflammasomes, qui sont les plateformes d'activation des caspases inflammatoires.

Chez l'homme, il existe quatre caspases inflammatoires : les caspases 1, 4, 5 et 12.

Le rôle de la caspase 1 dans l'inflammation est très largement décrit dans la littérature. Après son recrutement et son activation au sein de l'inflammasome, elle permet le clivage des précurseurs des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18 (Thornberry et al., 1992), ce qui conduit à leur maturation et à leur sécrétion, nécessaire à la complémentarité réponse immunitaire innée. (Ghayur et al., 1997).

Tout comme la caspase 1, la caspase 8 a récemment été montrée comme pouvant être impliquée dans la réponse inflammatoire. En effet, le clivage de la pro-IL-1 β peut être également induit par la caspase 8. (Maelfait et al., 2008; Vince et al.)

Le rôle des caspases 4 et 5 est moins bien caractérisé, mais il semble identique à celui de la caspase 11, son homologue murin. Ainsi, la caspase 11 est capable d'induire de manière indirecte la sécrétion d'IL-1 β grâce à son interaction avec la caspase 1.

Quant à la caspase 12, elle est décrite comme non fonctionnelle chez la majorité des individus, puisqu'elle est sous sa forme tronquée (Fischer et al., 2002). Toutefois quand elle est synthétisée sous sa forme longue, la réponse inflammatoire de ces individus exposés aux endotoxines est réduite ce qui augmente le risque de développer une septicémie (Saleh et al., 2004). Enfin, une activation des caspases inflammatoires peut également conduire à une forme de mort cellulaire appelée pyroptose qui se caractérise par une rupture de la membrane plasmique et un relargage du contenu pro-inflammatoire intracellulaire. En effet, la caspase 1 peut activer la caspase 7, et une nucléase encore non identifiée à ce jour va cliver l'ADN et induire une condensation nucléaire sans compromettre l'intégrité du noyau (Bergsbaken and Cookson, 2007; Molofsky et al., 2006).

b2. Caspases et Différenciation

Outre leur implication dans l'induction de différents types de mort cellulaire, les caspases jouent également un rôle prépondérant dans certains processus de différenciation cellulaires. Leurs rôles peuvent être différents en fonction du contexte. Dans le cas de la différenciation kératinocytaire ou érythrocytaire, elles contribuent à l'énucléation cellulaire qui caractérise l'étape finale de la différenciation de ces cellules. Cependant, ce n'est pas leurs seuls rôles puisque les caspases sont aussi indispensables à la différenciation des monocytes en macrophages ainsi qu'à la différenciation ostéoclastique, bien qu'aucune énucléation ne se produit au cours de ces processus de différenciations (Miura).

Dans les paragraphes suivants, seule l'implication des caspases dans les processus de différenciation des cellules hématopoïétiques sera décrite.

b2.1. La Différenciation Erythrocytaire

L'érythropoïèse résulte de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique en érythrocytes. L'érythropoïétine (Epo) et le stem cell factor (SCF) sont les deux principales cytokines permettant l'induction de ce processus.

Au cours du stade terminal de la différenciation érythrocytaire, la chromatine ainsi que le cytoplasme se condensent et l'érythroblaste perd ses mitochondries et son noyau. Ces

événements, semblables à ceux retrouvés au cours d'un processus apoptotique, laissent suggérer l'implication des caspases lors du stade terminal de la différenciation érythrocytaire. Ainsi, l'implication des caspases au cours de ce processus de différenciation fut établie la première fois par Zermati *et al.* qui démontrèrent *in vitro* leur activation ponctuelle et leur nécessité. En effet, l'inhibition des caspases conduit à l'arrêt de la différenciation érythrocytaire au stade basophile (Zermati et al., 2001).

Ainsi, l'activation de la caspase 8, bien que transitoire permet l'activation de la caspase 3 qui enclenche le clivage protéolytique de nombreuses protéines telles que la poly ADP-ribose polymérase 1 (PARP1), la lamine B et acinus responsables des changements cellulaires décrits ci-dessus. Toutefois, contrairement aux conditions apoptotiques, le facteur de transcription essentiel à la différenciation érythrocytaire, GATA-1, est protégé de l'activité protéolytique des caspases par son interaction avec HSP70 qui dans ces conditions de différenciation migre au niveau du noyau.

b2.2. La Différenciation macrophagique

Comme décrit précédemment, le monocyte issu du sang périphérique, en réponse au CSF-1 se différencie en macrophage. Au cours de ce processus de différenciation, les caspases sont transitoirement activées et ceci indépendamment de toute induction d'apoptose.

Initialement, l'activation des caspases au cours la différenciation du monocyte en macrophage a été observée dans une lignée cellulaire leucémique dénommée U937. En effet, la stimulation des U937 par un ester de phorbol tel que le TPA, induit leur différenciation en macrophage. Cette différenciation est abolie en présence d'inhibiteur de caspases (Sordet et al., 2002).

Cette implication des caspases dans la différenciation macrophagique fut validée ensuite grâce à un modèle murin déficient pour la caspase 8 dans le compartiment myéloïde. Les précurseurs myéloïdes isolés à partir de la moelle osseuse de ces souris sont incapables, *ex vivo*, de se différencier en macrophage lorsqu'ils sont stimulés par du CSF-1 (Kang et al., 2004). En effet, en réponse au CSF-1, la caspase 8 interagit avec la protéine adaptatrice FADD, la serine/thréonine RIP1 et l'isoforme longue de FLIP. Ce complexe permet le clivage de RIP1 ce qui génère un fragment qui inhibe la transcription de NFκB, lequel est activé transitoirement durant la différenciation macrophagique (Rebe et al., 2007). Une fois activée, la caspase 8 induit l'activation de la caspase 3, qui va cliver de nombreux substrats durant la

différenciation macrophagique. Ces protéines peuvent être nucléaires comme la Nucléophosmine (NPM) ou encore cytoplasmiques comme la kinase RIP1 (Cathelin et al., 2006).

Dans ce contexte de différenciation, l'activation des caspases est associée à la dépolarisation mitochondriale qui induit un relargage du cytochrome C et ceci en l'absence du clivage de PARP1, donc indépendamment de l'induction d'une mort cellulaire par apoptose. Cette dépolarisation des mitochondries est indispensable à la différenciation macrophagique car la surexpression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique, inhibe l'induction de la différenciation macrophagique (Sordet et al., 2002).

De manière intéressante, durant la différenciation dendritique des monocytes l'activation des caspases n'est pas requise (Kang et al., 2004; Sordet et al., 2002). *A contrario*, l'activation des caspases est indispensable à la différenciation des monocytes en ostéoclastes en réponse au CSF-1 et au RANK-L. Ainsi, les souris invalidées pour la Caspase 3 présentent un nombre réduit d'ostéoclastes. Les précurseurs ostéoclastiques de ces souris ne sont plus capables *ex vivo* de se différencier en ostéoclastes (Szymczyk et al., 2006).

Le rôle du clivage tardif de la plupart des substrats des caspases, au cours des processus de différenciation, reste à établir. Toutefois, seul le clivage de la Nucléophosmine a été étudié. NPM est une protéine ubiquitaire de 38 KDa qui transite entre le noyau et le cytoplasme. Elle est multifonctionnelle puisqu'elle est impliquée dans la duplication du centrosome, le maintien de l'intégrité génomique et la biogénèse des ribosomes. Au cours de la différenciation macrophagique, NPM est clivé à la fois par les caspases et les cathepsines générant ainsi deux fragments de 30 KDa et de 20 KDa. Les fragments de clivages de NPM n'ont pas de rôle dans la différenciation macrophagique. Cependant, ils sont impliqués dans la fonctionnalité des macrophages puisqu'ils contribuent à leur motilité, à leur migration et à leur potentiel phagocytaire. Par ailleurs, la forme entière de NPM est impliquée dans la réponse au LPS. En effet, elle permet de modérer la production de cytokines inflammatoires par le macrophage. Ainsi plus que dans la différenciation macrophagique, NPM joue un rôle dans la fonctionnalité et l'activation des macrophages (Guery et al.).

D'autres études devront être menées pour permettre de comprendre comment certaines de ces protéines telles que PARP1 et lamine B sont protégées lors de la différenciation

macrophagique (Sordet et al., 2002) tout en étant clivée par les caspases au cours de la différenciation érythrocytaire (Zermati et al., 2001).

3. Implication des Caspases dans la Carcinogénèse

Notre organisme est continuellement exposé à des agents nocifs ou à des pathogènes qui vont perturber notre homéostasie. Ainsi, plusieurs mécanismes sophistiqués sont mis en œuvre pour lutter contre le développement de cancers, dont la mort par apoptose. Les caspases sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie cellulaire puisqu'elles permettent l'élimination par apoptose des cellules vieillissantes ou devenues anormales. Il n'est donc pas surprenant, que la dérégulation des caspases ou des voies qui régulent leur activation puissent aider à la persistance de cellules indésirables et promouvoir la tumorigénèse. D'autre part, les caspases étant des protéases, une activation exacerbée induit la dégradation de nombreuses protéines nécessaires au bon fonctionnement de la cellule et engendre entre autre, l'apparition de maladie neuro-dégénérative. Outre leur dérégulation dans leur fonction apoptotique, l'insuffisance d'activation de caspases inflammatoires peut conduire à une hypersensibilité aux infections et *a contrario*, leur sur-activation induit des maladies inflammatoires chroniques. Il est donc nécessaire de contrôler parfaitement leur activation.

Cependant, les gènes codants pour les caspases ne sont que rarement mutés dans les cancers. C'est pourquoi l'ensemble des cancers où l'activation des caspases est perturbée, résulte en définitive, de dérégulations des voies de signalisation menant à l'induction de l'apoptose ou encore à une perturbation de l'équilibre entre les membres de la famille Bcl-2 (pro et anti apoptotique).

Ainsi, la sur-expression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est bien documentée dans les Myélomes Multiples (MM), Leucémies Lymphoïdes Chroniques (LLC) ou encore les Leucémies Aigues Myéloïdes (LAM) ou Leucémies Lymphoïdes Aigües (LLA) (Reed, 2008), (Reed and Pellecchia, 2005).

Myélome Multiple :

Le Myélome multiple (MM) est une maladie clonale des lymphocytes B ou plus précisément des plasmocytes, qui se caractérise par une accumulation de plasmocytes dans la moelle osseuse. Une autre caractéristique de cette pathologie est une forte sécrétion de VEGF et

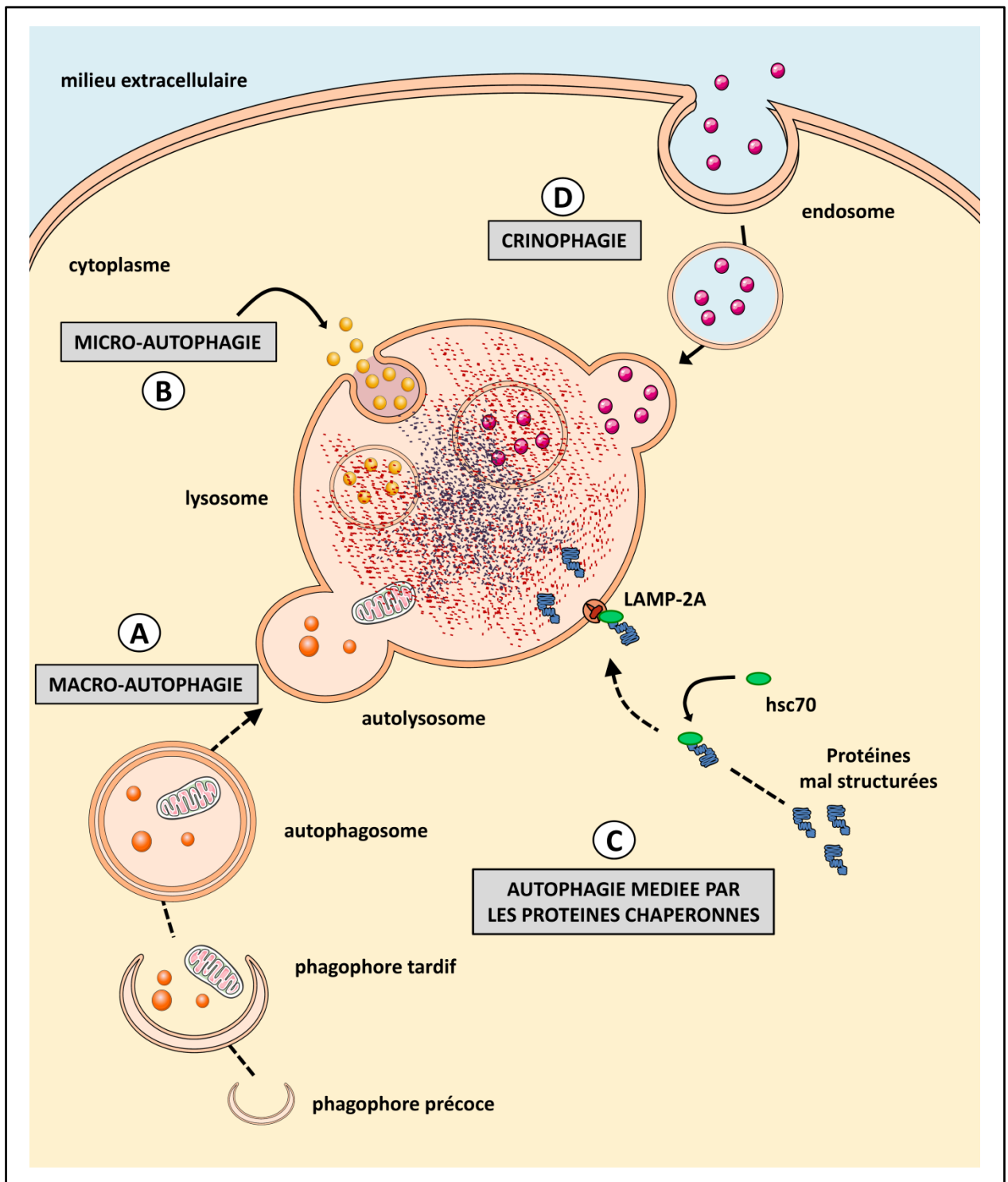
d'IL6 qui active la voie de signalisation JAK2/STAT3 ce qui permet d'augmenter préférentiellement la transcription et par la même l'expression de Mcl-1 (Myeloid cell leukemia), un membres anti-apoptotique de la famille Bcl-2 (Jourdan et al., 2003) , (Derenne et al., 2002). Cette surexpression de Mcl-1 dans les plasmocytes va ainsi perturber l'équilibre cellulaire en faveur d'une désensibilisation à la mort cellulaire dépendante des caspases. Ceci confère ainsi aux plasmocytes un avantage prolifératif et permet également l'établissement de résistances aux chimiothérapies grâce à la protection contre l'apoptose (Kato et al., 1998) (Le Gouill et al., 2004).

B. L'Autophagie

1. Définition

Le maintien de l'homéostasie cellulaire dépend d'un équilibre finement régulé entre la biosynthèse et le catabolisme de macromolécules. Afin de maintenir cette balance homéostasique, la cellule dispose de deux processus de dégradation en fonction des caractéristiques des éléments cellulaires à dégrader. La majorité des protéines dont la demi-vie est courte, sont dégradées spécifiquement par le protéasome, après avoir été ubiquitinylées. Les protéines possédant une demi-vie plus longue sont dégradées par la voie lysosomale. Le mécanisme permettant de dégrader les composants cytoplasmiques ou cellulaires, *via* la voie lysosomale, est appelé autophagie. Le terme autophagie provient du grec *auto-* qui signifie « soi-même », et *-phago* qui signifie « manger ». En somme, l'autophagie est un processus qui consiste en une auto digestion des composants cellulaires en réponse à un stress environnemental comme la déprivation en acides-aminés, le stress du réticulum endoplasmique ou lors de certaines infections virales et bactériennes.

Quelque soient les conditions dans lesquelles l'autophagie est induite, elle permet aussi bien le recyclage des éléments du cytoplasme (protéines à demi-vie longue, avec des anomalies conformationnelles ou encore des agrégats insolubles) que celui des organelles. Ce processus contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire, protégeant ainsi les cellules des divers stress environnementaux grâce à la production d'énergie.



inspiré de Tardy *et al.*, 2011

Figure 11: Les quatre types d'autophagies présentes dans les cellules de mammifères. (A) la macro-autophagie ou autophagie se caractérise par la formation *de novo* d'un phagophore dont les extrémités vont fusionner pour former un autophagosome. Celui-ci va ensuite subir une étape de maturation avant de fusionner avec le lysosome (autolysosome) spécialisé dans la dégradation des macromolécules. **(B)** La micro-autophagie se définit par la séquestration et la dégradation directe d'une partie du cytoplasme suite à l'invagination de la membrane du lysosome. **(C)** L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes se met en place pour la dégradation des protéines possédant un motif KFERQ. Ce motif est reconnu par la protéine chaperonne hsc70 qui va adresser son substrat au lysosome. La protéine LAMP-2A sert de récepteur à ce substrat pour permettre sa translocation dans la lumière du lysosome. **(D)** La crinophagie représente la fusion directe des vésicules de sécrétion avec les lysosomes.

2. Les différentes formes d'Autophagie

Selon le mécanisme par lequel le matériel cytoplasmique est amené au lysosome pour y être dégradé, il a été caractérisé 4 formes d'autophagie (Eskelinen, 2008) (**Figure 11**).

a. La Macroautophagie ou Autophagie

La macroautophagie, plus communément appelée autophagie, est un processus majeur responsable du catabolisme cellulaire. Celle-ci est très conservée car elle est présente à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. L'autophagie se caractérise par la formation dans le cytoplasme, d'une double membrane, le phagophore qui s'allonge et s'enroule autour d'une partie du cytoplasme à dégrader, formant ainsi un autophagosome. Les autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes formant des autolysosomes. Les hydrolases lysosomales, principalement les cathépsines, vont dégrader les protéines cellulaires séquestrées, d'autres hydrolases lysosomales sont impliquées dans la dégradation des sucres et des lipides complexes. Les produits de cette hydrolyse vont être transportés vers le cytoplasme où ils seront réutilisés. Chez la levure, la membrane du phagophore est issue d'une membrane dont la composition est proche de celle de la vacuole et est appelée PAS pour Pre-Autophagosomal Structure (Suzuki and Ohsumi, 2007). Chez les mammifères, la provenance de la membrane à l'origine du phagophore n'est pas clairement déterminée. De nombreuses études ont suggéré que cette membrane serait issue du réticulum endoplasmique lisse (Dunn, 1994) mais d'autres arguments suggèrent également une provenance plasmique ou encore golgienne (Chan and Tang).

Outre son aspect non sélectif, cette autophagie peut être aussi spécifique de la dégradation de certaines organelles. En effet, l'autophagie a longuement été considérée comme un processus non sélectif destiné à dégrader des protéines à longues durées de vie ou des composants cytoplasmiques. Depuis, de nombreux types d'autophagie sélective ont été découverts. Selon le type de stress induit, les autophagosomes peuvent spécifiquement séquestrer et dégrader des mitochondries, du réticulum endoplasmique ou encore des agrégats protéiques insolubles. On parlera respectivement de mitophagie, de réticulophagie ou d'agrégophagie (Klionsky, 2007).

	Mammifères	Levure	Type d'activité	Fonctions connues au cours de la formation des autophagosomes
INITIATION DU PHAGOPHORE	ULK1	Atg1	Ser/Thr kinase	Phosphorylation de substrats impliqués dans l'initiation de l'autophagie
	mAtg13	Atg13	Régulateur	Interrupteur moléculaire contrôlé par mTOR/TOR
	FIP200	Atg17	Régulateur	Formation d'un complexe de stabilisation au sein du phagophore
	-	Atg29	Interacteur de Atg17	
	-	Atg31	Interacteur de Atg17	
	Atg101	-	Régulateur	Interaction avec mAtg13 au sein du complexe ULK1-mAtg13-FIP200
NUCLEATION	Beclin1	Atg6	-	Liaison de Beclin1 avec VPS34 et VPS15 / liaison de Atg6 avec Vps34 et Vps15
	VPS34	Vps34	PI3K classe 3	Recrutement des protéines se liant au PI(3)P au niveau du phagophore
	VPS15	Vps15	Ser/Thr kinase	Ancrage du complexe de Beclin1-VPS34- VPS15 à la membrane du phagophore
	Atg14L	Atg14	Régulateur	Interaction avec le complexe Beclin1-VPS34- VPS15 Stimulation de l'activité kinase VPS34
	UVRAG	Vps38	Régulateur	Interaction avec le complexe Beclin1-VPS34- VPS15, exclusion mutuelle entre Atg14L et UVRAG Stimulation de l'activité kinase VPS34 et de l'activité GTPase de Rab7
	Rubicon	-	Régulateur	Interaction avec le complexe Beclin1-VPS34- VPS15-UVRAG Répression de l'activité kinase VPS34
ÉLONGATION ET FERMETURE DE L'AUTOPHAGOSOME	Atg12	Atg12	-	Mise en place d'un système de conjugaison LC3/Atg8-PE Support mécanique de l'élongation du phagophore et de la fermeture de l'autophagosome
	Atg5	Atg5	-	
	Atg16L	Atg16	-	
	LC3	Atg8	-	Conversion d'une forme cytosolique (LC3-I) en une forme enchâssée dans la membrane du phagophore (LC3-II) Support mécanique de l'élongation du phagophore et de la fermeture de l'autophagosome
	HsAtg4	Atg4	Protéase à cystéine	Démasquage du résidu Glycine 120 de la protéine LC3 Recyclage de la protéine LC3-II enchâssée dans la membrane externe des autophagosomes à la fin de la réponse autophagique
	Atg7	Atg7	E1-ligase	Pilotage enzymatique des conjugaisons Atg12-Atg5 et LC3-PE
	Atg10	Atg10	E2-ligase	Pilotage enzymatique des conjugaisons Atg12-Atg5
	Atg3	Atg3	E2-ligase	Pilotage enzymatique des conjugaisons LC3-PE
	mAtg9	Atg9	Protéine transmembranaire	Trafic continu entre des structures périphériques (TGN, endosomes, mitochondrie) et l'autophagosome au début de son élongation Ancrage dans la membrane de l'autophagosome Contrôle de la réaction de lipidation de la protéine LC3

Tableau 3 : Les protéines ATG, acteurs de la formation et de l'élongation des autophagosomes. Les protéines Atg et leurs partenaires protéiniques essentiels à l'induction de l'autophagie sont séparés en trois groupes fonctionnels intervenant tout au long de la biogénèse de l'autophagosomes. Le type d'activité enzymatique et la fonction qui leur sont associés sont résumés dans ce tableau.

Finalement, l'élimination de micro-organismes (bactéries ou parasites) présents dans la cellule est appelée xénophagie. La xénophagie joue un rôle essentiel dans la réponse et le maintien de l'immunité cellulaire.

b. La Microautophagie

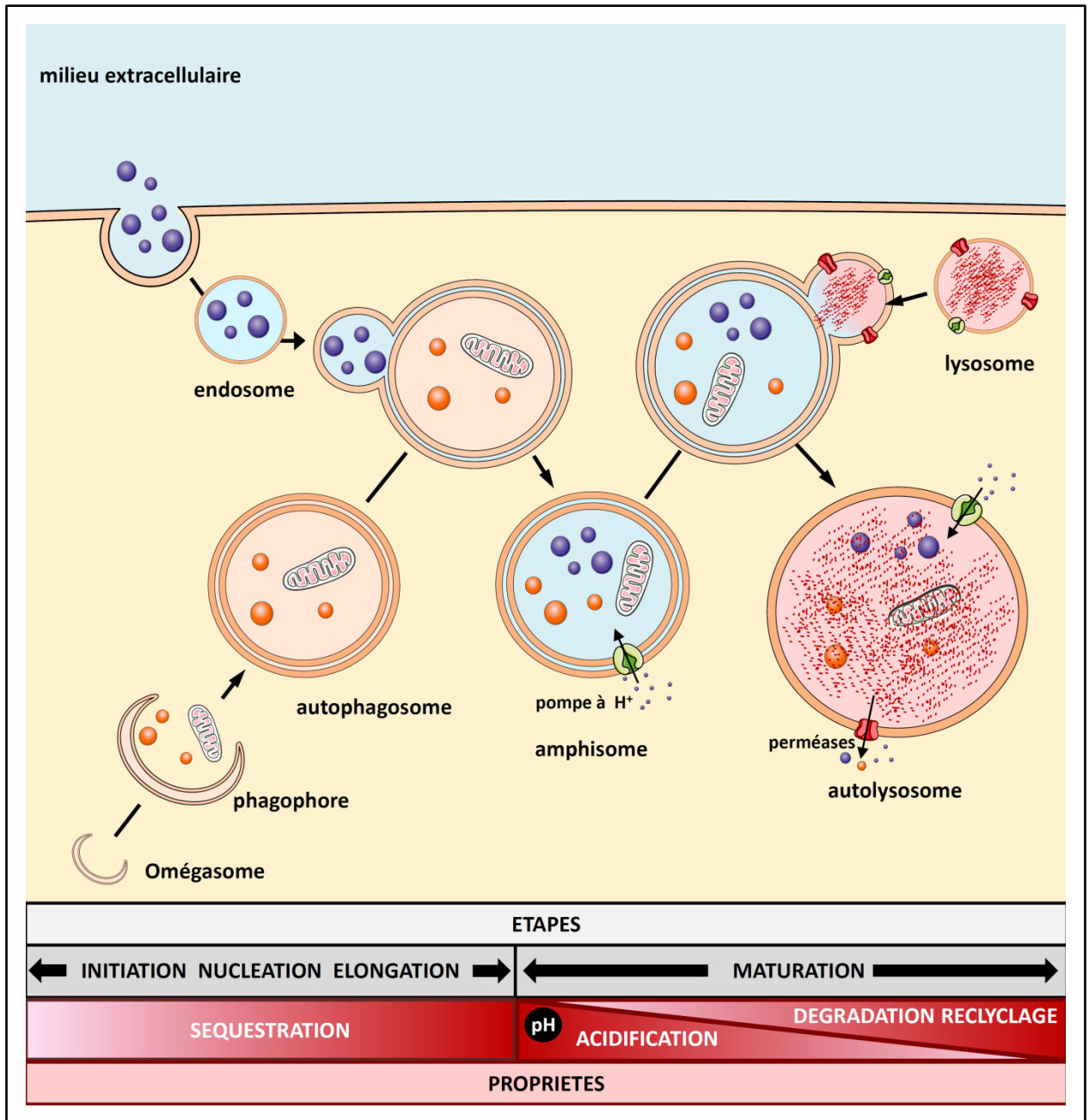
La microautophagie est un processus de dégradation lysosomale non sélectif. En contact direct avec le lysosome, le contenu cytoplasmique à dégrader va être séquestré grâce à l'induction d'invaginations de la membrane lysosomale. Ces invaginations s'allongent et forment des tubes autophagiques. A leur extrémité se forment des vésicules, une scission s'opère, libérant ainsi les vésicules au sein de la lumière lysosomale. Dans certains cas, la microautophagie peut être sélective, toutefois ceci n'a été décrit que chez la levure (Li et al.).

c. L'Autophagie Médiée par les Chaperonnes

A l'inverse des deux types d'autophagie décrit précédemment, l'autophagie médiée par les chaperonnes ou CMA (Chaperone Mediated Autophagy) est exclusivement sélective (Cuervo and Wong).

Les protéines dégradées par cette voie autophagique sont ciblées spécifiquement grâce à l'expression d'un pentapeptide KFERQ (Dice, 1990). La reconnaissance de ce motif a lieu dans le cytoplasme. Ce motif est reconnu par une chaperonne cytosolique, la protéine de choc thermique, hsc70 (heat shock cognate protein of 70 KDa). Une fois reconnue par hsc70, la protéine cible est acheminée à la surface du lysosome puis transloquée dans la lumière du lysosome grâce à la protéine LAMP-2A. LAMP-2A est présente à la surface du lysosome sous forme de monomère et l'association de plusieurs monomères conduit à la formation d'un multi-complexe de LAMP-2 requis pour la translocation du substrat (Bandyopadhyay et al., 2008).

La CMA est généralement impliquée dans la dégradation des protéines ayant des anomalies structurales ou étant peroxydées ce qui contribue à la régulation des niveaux intracellulaires de certaines enzymes et de facteurs de transcription. Le rôle de la CMA est déterminant pour le recyclage des acides aminés après une période prolongée de carence nutritive, elle est graduellement activée après 8 à 10h de privation et peut persister à des niveaux d'activité maximale pendant 3 jours (Cuervo et al., 1995) (Massey et al., 2006).



Inspiré de Klionsky *et al.*, 2007, Eskelinen 2008, et Mehrpour *et al.*, 2010

Figure 12: Les différentes étapes de la formation d'un autolysosome. La formation de l'autophagosome s'initie par la nucléation d'une structure membranaire spécifique connue sous le nom de phagophore. Alors que chez la levure l'origine de cette membrane est déterminée (le PAS), elle reste encore à définir dans les cellules de mammifères. Une fois le phagophore isolé, il subit des étapes d'élongation puis de fermeture pour former l'autophagosome. Cet autophagosome fusionne avec les endosomes et est converti en amphisome. Au cours de cette étape, l'amphisome peut s'acidifier grâce à l'activation de pompes à protons apportées par les endosomes. Enfin, l'amphisome fusionne avec les lysosomes pour former un autolysosome, spécialisé dans la dégradation du matériel séquestré par l'autophagosome. Des perméases membranaires interviennent alors dans l'export et le recyclage des produits de cette dégradation.

d. La Crinophagie

Enfin, il existe un dernier type d'autophagie, très peu décrit, la crinophagie. Présente à l'état basal dans la cellule, elle est responsable de la fusion directe de vésicules de sécrétion surnuméraires permettant ainsi de réguler la sécrétion cellulaire.

3. La régulation de l'Autophagie

La formation de l'autophagosome est orchestrée par un ensemble de protéines nommées ATG pour « AuTophagy related » proteins (**Tableau 3**). Une trentaine de gènes codant pour les protéines ATG ont été identifiés grâce à des criblages génétiques chez la levure. Dix-huit de ces ATG sont connues pour être recrutées lors de l'isolation de la membrane de l'autophagosome. La formation de l'autophagosome peut être divisée en trois étapes : l'initiation, la nucléation et l'élongation. L'initiation est la transmission du signal à la membrane source nécessaire à la genèse du phagophore, la nucléation mène à l'isolation de cette membrane et enfin l'isolation se déroule jusqu'à ce que l'autophagosome soit totalement formé (**Figure 12**).

a. L'Initiation

Chez la levure, lorsque l'autophagie est induite, la protéine sérine/thréonine Kinase ATG1, forme un complexe avec ATG13, ATG17, ATG29 ET ATG31 (Cheong et al., 2008). Chez les mammifères, ce complexe est composé des protéines ULK-ATG13-FIP200-ATG101. La formation de ces complexes chez la levure comme chez les mammifères est indispensable à l'initiation de l'autophagie (**Figure 13**).

Les homologues mammifères d'ATG1 sont au nombre de 5, Unc-51-like kinase(ULK) ULK-1, ULK-2, ULK-3, ULK-4, et STK36 et l'homologue d'ATG17 étant FIP200. ULK1 et ULK2 présentent une très forte homologie avec ATG1 alors que ULK3, ULK4 et STK36 ne conservent que le domaine kinase. Bien que ULK1, ULK2 et ULK3 semblent contribuer au processus autophagique, seuls ULK1 et ULK2 jouent un rôle important dans l'induction de l'autophagie. Au sein du complexe de mammifère, ATG101 stabilise l'expression d'ATG13, et interagit de façon stable avec le complexe ULK1 et FIP200, et ceci quel que soit les conditions énergétiques de la cellule (Hosokawa et al., 2009), (Mercer et al., 2009). Bien qu'il n'y ait pas d'orthologue humain d'ATG29 et d'ATG31, ni d'orthologue chez la levure

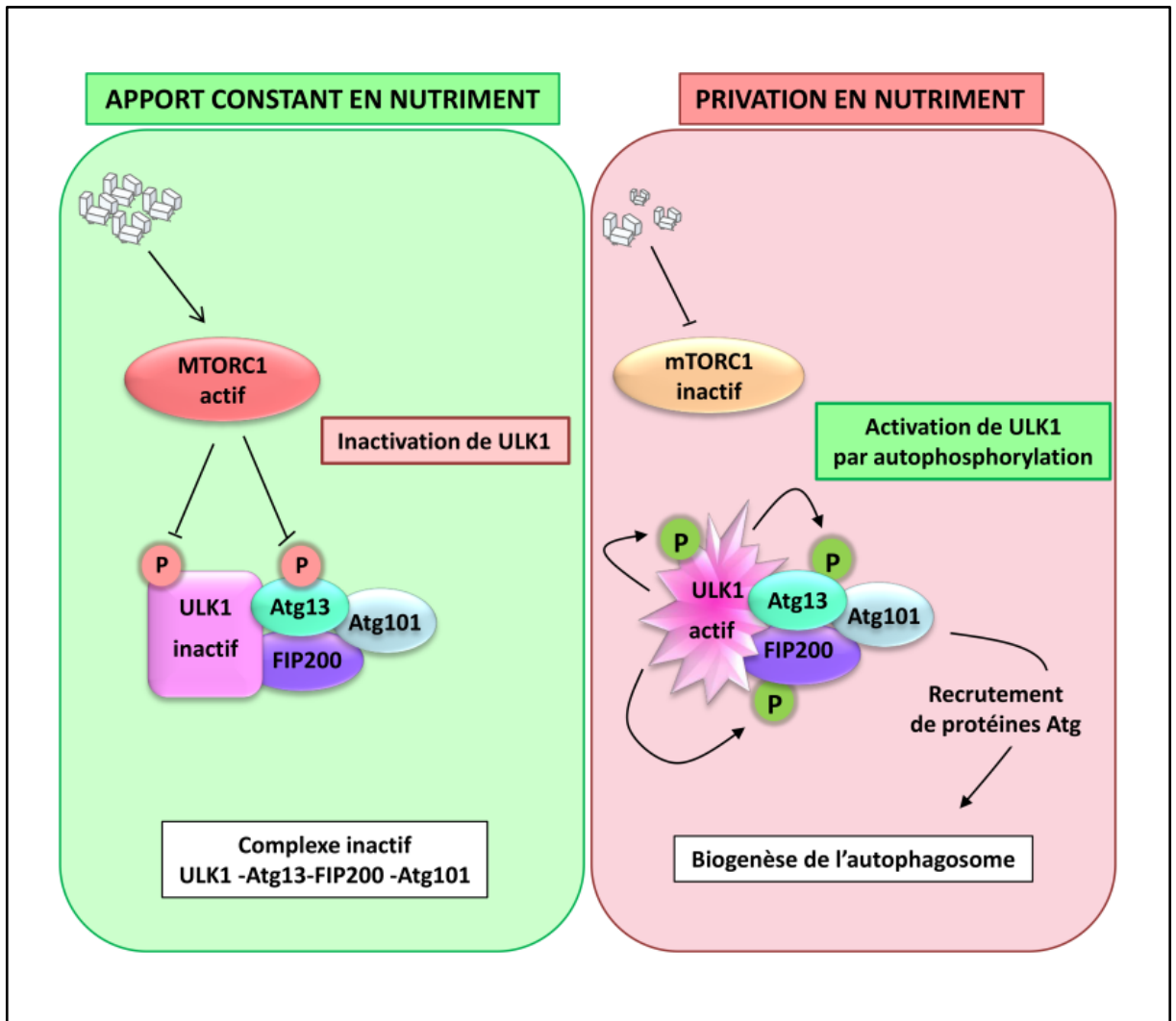


Figure 13: L'étape d'initiation du phagophore. Chez les mammifères l'apport constant en nutriments active le complexe mTORC1 qui inhibe alors le complexe d'initiation ULK1-Atg13-FIP200-Atg1001 via la phosphorylation inhibitrice de ULK1 et de Atg13. La privation en nutriments provoque l'inactivation de mTORC1 et autophosphorylation activatrice de ULK1 qui peut alors initier la biogénèse de l'autophagosome par la phosphorylation de FIP200 et Atg13.

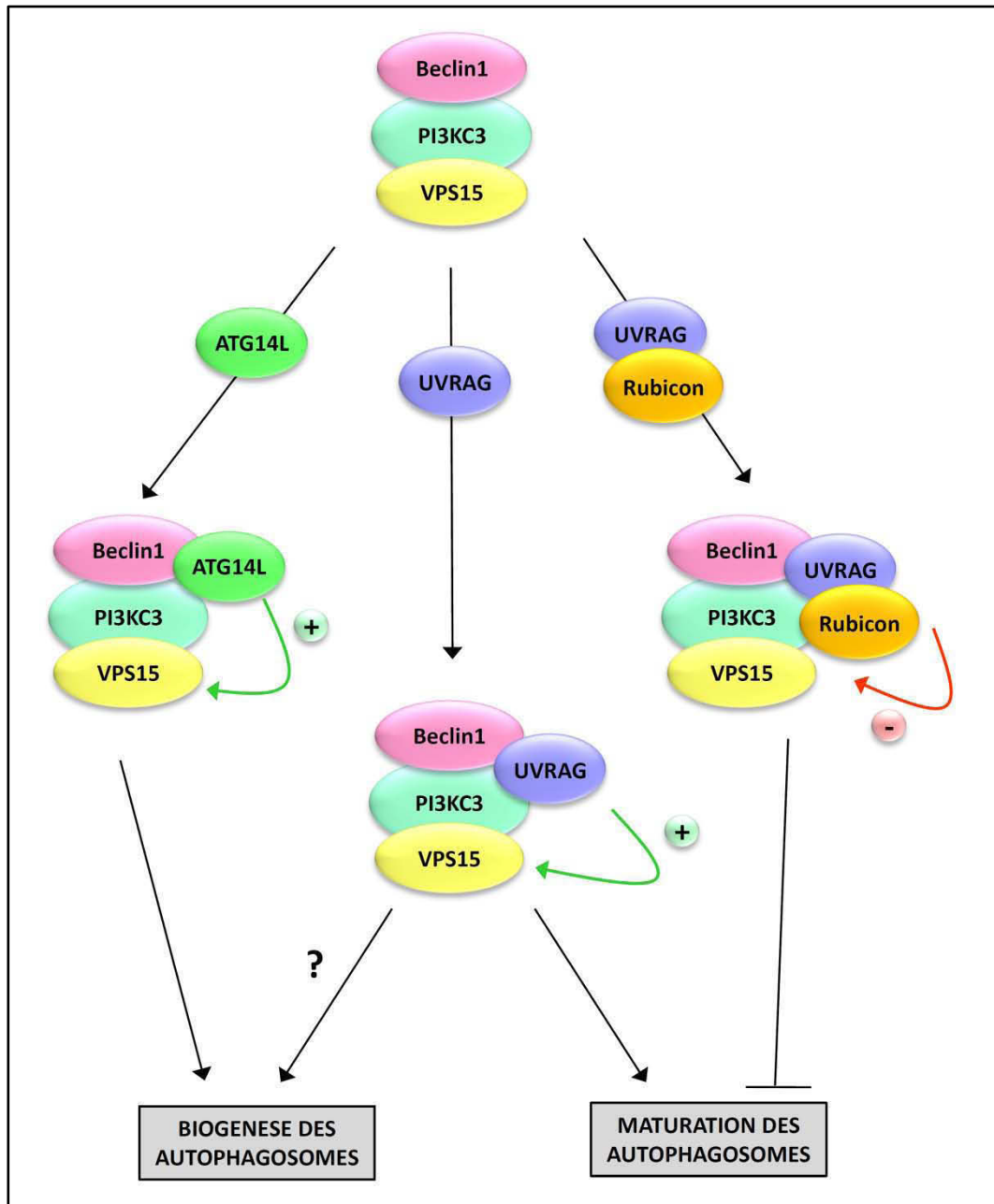
d'ATG101, on observe tout de même une similitude dans la composition de ces complexes, suggérant des fonctionnalités similaires. D'autre part, la localisation membranaire du complexe reste la même, elle se situe au niveau du phagophore chez les mammifères et son équivalent chez la levure, le PAS (Jung et al., 2009). Le domaine C-terminal de ULK1, appelé Early Autophagy Targeting/tethering (EAT) semble être essentiel pour le recrutement du complexe au phagophore (Chan et al., 2009). De plus, un ensemble acides aminés chargés positivement localisés à l'extrémité N-terminale d'ATG13 (protéine membre du complexe ULK1), permet l'interaction avec des phospholipides chargés négativement présents dans les membranes ce qui permet la translocation du complexe ULK1 et le recrutement d'ATG14, une protéine membre du complexe Beclin1-PI3KC3, à l'omégasome (Karanasios et al.). L'omégasome a été identifié pour la première fois en microscopie électronique à la surface du réticulum endoplasmique. Il désigne la déformation de la membrane à l'origine de la biogénèse du phagophore. Cette excroissance a l'aspect de la lettre grecque Ω , d'où son appellation.

En effet, pour être recruté au niveau du réticulum endoplasmique, le complexe ULK1 est capable d'interagir avec des structures pré-existantes exprimant la protéine transmembranaire VMP1, ce qui serait à l'origine de la courbure de la membrane à l'origine du phagophore.

Enfin, ULK1 est indispensable à l'induction de l'autophagie puisque la simple diminution de son expression est capable d'inhiber ce processus et ceci dans différents contextes (Chan et al., 2007). En revanche et à l'inverse des souris invalidées pour les gènes de l'autophagie *atg5* et *atg7*, les souris *ulk1*^{-/-} et *ulk2*^{-/-} naissent viables et sont capables de survivre à la période post-natale (Cheong et al.). Elles présentent néanmoins des défauts dans l'élimination des mitochondries au cours de la maturation des réticulocytes, indiquant un rôle spécifique de ULK1 dans la dégradation sélective des mitochondries (mitophagie) notamment durant l'érythropoïèse (Kundu et al., 2008).

b. La Nucléation

Il existe 2 principaux complexes intervenants dans la nucléation du phagophore chez la levure, les complexes 1 et 2. Ils sont composés tous les deux d'ATG6-Vps34-Vps15 et ne diffèrent que par la présence d'un quatrième partenaire d'interaction, il s'agit d'ATG14 pour le complexe 1 et de Vps38 pour le complexe 2. Les complexes homologues chez les



Inspiré de Funderburk *et al.*, 2010

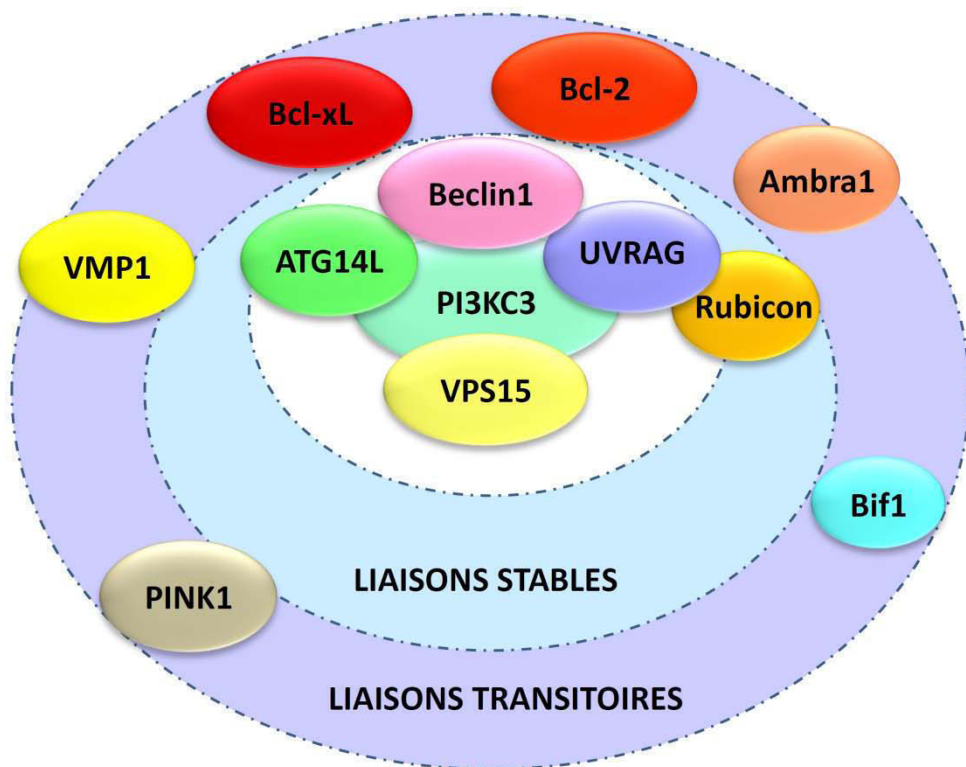
Figure 14: L'étape de nucléation sous le contrôle des complexes dépendants de Beclin1. Dans les cellules de mammifères la protéine Beclin1 est également comprise dans le complexe formé par Vps34-PI3KC3 et par VPS15. Différentes protéines vont par la suite interagir avec ce complexe pour le réguler au cours du processus autophagique. Ainsi ATG14L et UVRAG s'associe de manière exclusive avec ce complexe pour le réguler positivement. La protéine Rubicon qui interagit avec le complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15-UVRAG est, au contraire, un régulateur négatif de l'autophagie.

mammifères sont composés respectivement des protéines Beclin1-PI3KC3-VPS15 et ATG14L ou UVRAG. La PI3KC3 présente dans le complexe, appartient à la famille des PI3K et permet la production de PI3P dans la cellule. VPS15 est une Sérine/Thréonine kinase qui intervient dans l'ancrage du complexe au niveau de la membrane du phagophore. La protéine ATG14L également appelée BARKOR (Beclin1 associated ATG key regulator), permet l'adressage du complexe à la membrane du phagophore et le recrutement de PI3P ainsi que d'autres protéines ATG. UVRAG est un suppresseur de tumeur (hVps38) qui ne peut interagir avec le complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15 que lorsqu' ATG14 est absent. En effet, les protéines UVRAG et ATG14L s'excluent mutuellement du complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15 (Itakura et al., 2008; Itakura and Mizushima, 2009). Bien que l'association de Beclin1 à UVRAG ou à ATG14L joue le même rôle dans l'induction de l'autophagie, ces complexes ont des fonctions différentes au cours de la formation et de la maturation de l'autophagosome. En effet, ATG14L co-localise avec le complexe ATG12-ATG5 et ATG16, des protéines spécifiques de l'élongation de la membrane du phagophore, et l'extinction d'ATG14L dans les HeLa a pour conséquence de bloquer l'induction du flux autophagique. A *contrario*, l'absence d'expression d' UVRAG dans ces cellules n'a aucune conséquence sur l'induction du processus autophagique. Par ailleurs, UVRAG est présent dans les endosomes où Rab9 (Ras Like GTPases, marqueur des endosomes tardifs) est exprimée et ne co-localise avec aucune structure autophagique. Ainsi Beclin1 grâce à ses différents partenaires d'interaction, régule à la fois la formation de l'autophagosome *via* ATG14L ainsi que sa maturation grâce à son association avec UVRAG et/ou Rubicon (Matsunaga et al., 2009) (**Figure 14**).

En effet, la formation du complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15 est l'élément majeur de la nucléation. Afin de réguler finement cette étape, le complexe peut s'associer à différentes protéines pour moduler son activité.

Ainsi la fonction pro-autophagique de Beclin1 peut être inhibée par la protéine Rubicon qui peut se lier au complexe. Toutefois cette interaction avec Rubicon n'est détectée qu'au sein du complexe Beclin1-UVRAG, suggérant que Rubicon se lie au complexe par l'intermédiaire d'UVRAG (Zhong et al., 2009). Cette association avec Rubicon inhibe l'activité kinase de PI3KC3 et bloque la maturation de l'autophagosome en empêchant le trafic vésiculaire.

Par ailleurs, Beclin1 contient 3 domaines identifiés, un domaine BH3 en N-terminal, un domaine coiled-coil (CCD) central et un domaine ECD conservé au cours de l'évolution dans



Inspiré de Funderburk *et al.*, 2010

Figure 15: Partenaires d'interaction du complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15. Le principal mode de régulation de ce complexe passe par l'interaction de Beclin1 avec d'autres protéines qui vont faciliter ou, au contraire, inhiber son activité. Certaines de ces protéines, telles que Bcl-2, Bcl-xL ou encore la protéine Rubicon ont un rôle inhibiteur de l'autophagie, alors que d'autres en se liant transitoirement au complexe, seront des régulateurs positifs (VMP1, Ambra1, etc...) de l'autophagie.

les différentes espèces présent en C-terminal (Furuya et al., 2005). Grâce à son domaine BH3, Beclin1 peut interagir avec les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Pattingre et al., 2005), (Erllich et al., 2007). Cette interaction a pour conséquence de bloquer la formation du complexe Beclin1-PI3KC3 ce qui entrave l'induction de l'autophagie. Nous développerons plus en détails les interactions entre les membres de l'autophagie et les caspases/les membres de la famille Bcl-2 dans la partie III de ce manuscrit.

En plus de ces partenaires privilégiés cités ci-dessus, Beclin1 peut aussi interagir avec d'autres protéines incluant Bif-1, AMBRA1, PINK1 et VMP1 (**Figure 15**).

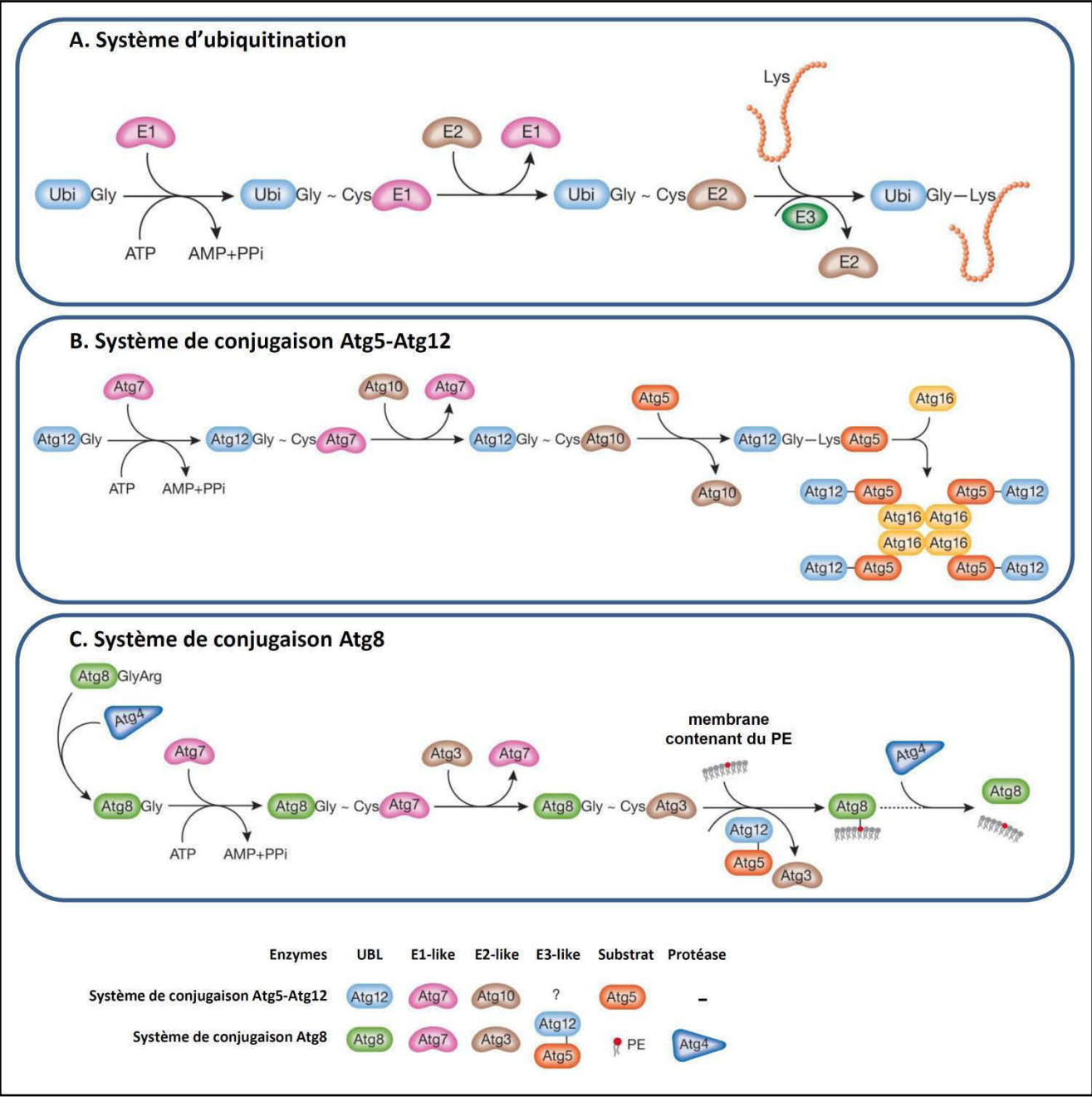
Bif-1 (Bax interacting factor 1) ou endophiline B1 qui se lie à UVRAG et permet ainsi de stabiliser et donc d'augmenter le nombre de complexe pro-autophagique Beclin1-PI3KC3-UVRAG (Takahashi et al., 2007).

Récemment, AMBRA1 a été identifié pour favoriser l'interaction entre Beclin1 et PI3KC3 induisant la nucléation de l'autophagosome et agissant comme un facteur essentiel de l'autophagie. En condition basale, AMBRA1 est séquestrée aux microtubules avec Beclin1, mais lorsqu'un stress autophagique est induit, ULK1 phosphoryle AMBRA1. Cette phosphorylation perturbe son interaction avec la Dynéine, ce qui permet la translocation du complexe vers le site d'initiation du phagophore (généralement le réticulum endoplasmique) (Di Bartolomeo et al.).

PINK1 est une sérine thréonine kinase qui se situe au niveau de la mitochondrie, elle est impliquée dans la régulation de la mitophagie (Geisler et al.). Son domaine C-terminal est capable d'interagir avec Beclin1 pour induire l'autophagie (Michiorri et al.).

Et enfin, VMP1, une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique, qui est fortement exprimée en cas de pancréatite, peut également interagir avec Beclin1. En condition non pathologique, sa région C-terminale est essentielle pour son interaction avec Beclin1 et son recrutement au niveau de la membrane. En effet, la mutation de ce domaine empêche la formation du complexe mais aussi le recrutement de LC3 à l'autophagosome (Nowak et al., 2009).

Lors de la formation du phagophore, le complexe Beclin1-PI3KC3-VPS15 est recruté au site de nucléation du phagophore pour y produire et phosphoryler les PdtIns permettant la production des PI3P, lesquels recruteront des facteurs nécessaires à la mise en place de la



Geng and Klionsky, 2008

Figure 16: Les systèmes de conjugaison de type ubiquitination Atg5-Atg12 et Atg8-PE (LC3-II). L'élongation du phagophore est dépendante des complexes Atg5-Atg12 et Atg8-PE. Pour former ces deux types de complexes, les protéines Atg5 et Atg12 ainsi que la protéine Atg8 et le groupement PhosphatidylEthanolamine (PE) doivent former des interactions covalentes. **(A)** Le système d'ubiquitination fait intervenir trois classes d'enzyme E1, E2 et E3-ligases chargées de transférer alternativement l'ubiquitine depuis l'enzyme E1 jusqu'à une protéine substrat associée à l'enzyme de type E3. **(B)** Le système de conjugaison Atg5-Atg12 utilise le même procédé enzymatique. Atg12 se substitue à l'ubiquitine et Atg5 se substitue au substrat. Le transfert est assuré par Atg7 (enzyme de type E1) et Atg10 (une enzyme de type E2). Atg16 s'associe au complexe Atg5-Atg12 de manière non covalente. **(C)** La protéine Atg8, une fois clivée par la protéase Atg4, est également prise en charge par Atg7 puis par Atg3 (enzyme de type E2) avant d'être transférée à un groupement PE. Le complexe Atg5-Atg12-Atg16, assimilé dans certaines publications à une enzyme de type E3, est essentiel à la lipidation d'Atg8.

structure membranaire du phagophore. Outre leur contribution dans la formation du phagophore, les PI3P ont été démontrés comme nécessaires à la stabilisation de ULK1 et de l'omégasome. Ainsi, une fois recruté sur son site d'activation et stabilisé, le complexe ULK1 phosphoryle Beclin1 ce qui augmente l'activité du complexe Beclin1-hVps34 (Russell et al.). Les complexes PI3KC3 et ULK1 sont recrutés aux membranes où ils agissent de manière synergique pour stimuler la production de PI3P et faciliter l'isolation de la membrane à l'origine du phagophore.

D'autre part, la protéine ATG13 qui appartient au complexe ULK1, est capable de lier les PI3P indiquant que le complexe ULK1 joue aussi un rôle important dans la stabilisation de PI3P au niveau du phagophore (Karanasios et al.).

L'ensemble de ces événements conduit à la nucléation de la membrane du phagophore et aux recrutements d'autres protéines ATG à l'omégasome.

c. L'Elongation - Maturation

Chez la levure comme chez les cellules de mammifères, la liaison covalente ou conjugaison entre certaines protéines ATG est nécessaire pour leur fonctionnement et leur rôle dans l'induction du processus autophagique. Ainsi, sur la trentaine de gènes *ATG* identifiés comme contrôlant l'autophagie, huit sont directement impliqués dans le système de conjugaison d'ATG5-ATG12 et d'ATG8-PE (**Figure 16**).

Le processus enzymatique impliqué dans cette action de conjugaison des protéines ATG est un système semblable à celui de l'ubiquitination et est désigné comme un système d'« ubiquitination-like ».

On parle d'« ubiquitination-like » car il partage de nombreuses similitudes avec le mécanisme d'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation par le protéasome.

Ce mécanisme nécessite 3 grandes familles d'enzymes appelées les E1, E2 et E3-ligases.

L'enzyme E1, se lie à une ubiquitine de manière ATP-dépendante grâce à la formation d'une liaison thioester entre la cystéine de E1 et la glycine terminale de l'ubiquitine. Cette réaction permet l'obtention d'une E1 complexée à une ubiquitine.

L'enzyme E1 va transférer son ubiquitine à une autre enzyme de conjugaison dite E2, qui va permettre le transfert de l'ubiquitine vers une ubiquitine ligase, appelée enzyme E3, capable de se lier à la protéine cible et de catalyser son ubiquitination sur un résidu lysine.

Ainsi, au cours de l'autophagie, nous observons un mécanisme similaire de transfert en cascade, non pas d'ubiquitine, mais de protéines ATG. Les deux systèmes de conjugaison décrits dans l'autophagie sont ATG5-ATG12 et ATG8/LC3, lesquels sont nécessaires à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome (Geng and Klionsky, 2008).

c1. Le système de conjugaison ATG5-ATG12 :

ATG7 est l'enzyme E1 like qui permet l'activation de la protéine ATG12. En effet, ATG12 est activé grâce à la formation d'une liaison thioester entre son résidu terminal, la glycine 186 et la cystéine 507 d'ATG7. (Tanida et al., 1999) Après son activation, ATG12 est transféré à ATG10, une enzyme de type E2 et est conjugué à sa protéine cible ATG5 grâce une liaison peptidique. (Shintani et al., 1999) A l'inverse de l'ubiquitine qui peut-être conjuguée à de multiples cibles, ATG5 semble être l'unique substrat d'ATG12. De plus, cette conjugaison est constitutive et irréversible. Par la suite, le système ATG12-ATG5 interagit avec ATG16L, une petite protéine coiled coil, menant à la formation du complexe ATG12-ATG5-ATG16L.

A ce jour aucune E3-like ligase n'a été identifiée comme impliquée dans le système de conjugaison ATG5-ATG12. En revanche, ce complexe peut avoir à lui seul une activité E3 ligase-like car il intervient dans le système de conjugaison d'ATG8 en catalysant le transfert de PE sur ATG8 (LC3) grâce à ATG3. Ainsi il favorise la lipidation de LC3, conduisant à son ancrage à la membrane (Hanada et al., 2007).

c2. Le système de conjugaison ATG8-PE :

Un autre système de conjugaison est nécessaire à l'élongation du phagophore, il s'agit du système ATG8. Ainsi pour pouvoir jouer son rôle dans l'élongation, ATG8 doit subir plusieurs modifications. Le résidu Arg117 présent en C-terminal d'ATG8 va être éliminé par l'action d'une protéase à cystéine ATG4, ce qui va avoir pour conséquence, l'exposition d'un résidu glycine en position 116. Cette glycine pourra ainsi former un pont thioester avec la cystéine 507 de la protéine ATG7 (site aussi impliqué dans le système de conjugaison ATG12- ATG5). La protéine ATG8, déletée de son arginine, va être transférée à une enzyme de type E2, ATG3. Enfin, l'étape finale de la lipidation d'ATG8 est l'ajout d'une phosphatidyléthanolamine (PE) au niveau du résidu glycine 116 (Ichimura et al., 2000).

A l'inverse de la conjugaison d'ATG12 à ATG5, la lipidation d'ATG8 est réversible. Ainsi, ATG8-PE peut être clivé par ATG4 pour générer de l'ATG8 libre (Kirisako et al., 2000).

Bien que la levure ne possède qu'un seul ATG8, il existe plusieurs homologues identifiés chez les mammifères, ils sont regroupés en deux sous-familles, LC3 (LC3A, B, B2, et C) et GABARAP (GABARAP, -L1, -L2 ou GATE16). Tous subissent les mêmes modifications catalysées par ATG4B, ATG3 et ATG7. Ces protéines permettent ainsi de transformer LC3-I en sa forme lipidée, LC3-II (l'équivalent de LC3-PE), protéine désormais capable de s'ancrer dans les membranes. Les membres de la famille LC3 aident à l'élongation et à la fermeture du phagophore. L'association de ces protéines cytosoliques et les complexes protéiques déjà présents dans les membranes permettent l'élongation de la membrane du phagophore. Avant la fermeture de la membrane créant un autophagosome, les ATG présents se dissocient et seuls les membres de la même famille LC3 restent associés. Après la fermeture de l'autophagosome, seule LC3-II (lipidés) reste présent à la surface de l'autophagosome.

Il est largement admis qu'ATG5 et ATG7 sont des protéines clés pour l'autophagie. Toutefois les souris déficientes pour ces deux gènes sont toujours capables de former des autophagosomes/autolysosomes et de réaliser une autophagie fonctionnelle (Nishida et al., 2009). Bien que la lipidation de LC3-II soit en général un excellent marqueur d'autophagie, elle est absente lors de l'induction de cette autophagie alternative, indépendante d'ATG5 et d'ATG7. Cette autophagie atypique, est cependant régulée par ULK1 et Beclin1. A l'inverse de l'autophagie conventionnelle, les autophagosomes semblent être générés de façon Rab9 dépendante. La membrane, nouvellement isolée, fusionne avec des vésicules issues du trans-golgi ou des endosomes tardifs (Nishida et al., 2009).

Ainsi dans ce nouveau modèle, de nombreuses « certitudes » sont ébranlées, puisque même cette autophagie indépendante d'ATG5 a été détectée dans des tissus embryonnaires, où elle joue aussi un rôle important dans la dégradation des mitochondries au cours de la différenciation érythrocytaire *via* ULK1 (Honda et al., 2014). L'ensemble de ces résultats indique que chez les mammifères, il existe au moins deux manières différentes d'induire de l'autophagie : la manière conventionnelle dépendante d'ATG5 et d'ATG7 et une autre, alternative indépendante de ces deux protéines.

Enfin, une fois l'autophagosome formé, il peut soit fusionner directement avec un lysosome pour former un autolysosome, soit fusionner en premier avec un endosome pour générer un amphisome, lequel fusionnera par la suite avec un lysosome pour générer un autolysosome. La formation transitoire de l'amphisome fournit le pH nécessaire pour le fonctionnement optimal des protéases lysosomales. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome est facilitée par les microtubules. Ainsi le rapprochement des protéines lysosomales LAMP1/2 et de Rab7 avec des protéines vésiculaires telles que vps34 SNARE et ESCRT va permettre la fusion de l'autophagosome avec le lysosome.

Cette fusion est régulée positivement par le complexe UVRAG-PI3KC3-Beclin1 et est régulée négativement par le complexe Rubicon-UVRAG-PI3KC3-Beclin1. UVRAG-PI3KC3 améliore l'activité GTPase de Rab7 ce qui favorise la fusion de l'autophagosome avec l'endosome ou le lysosome. Les hydrolases lysosomales incluant les cathepsines et les lipases, dégradent les composants intra-autophagosomal mais aussi LC3-II présent sur la surface interne de l'autophagosome. Les protéines LC3-II exprimées à la surface de la membrane externe de l'autophagosome vont être délipidées par ATG4B permettant ainsi leur recyclage. Les protéines LC3-I obtenues seront à l'origine de la formation d'autre autophagosomes.

Chez la levure, ATG15 une lipase vacuolaire et ATG22 une protéine membranaire présente dans les vacuoles, sont toutes deux indispensables à la dégradation des composants séquestrés.

4. Les voies de signalisation régulant l'Autophagie

L'autophagie est présente à un niveau basal dans la majorité des types cellulaires, indiquant son importance dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire. Elle peut être fortement induite en cas de déprivation en nutriment, c'est donc un processus majeur de la réponse adaptative aux conditions de stress. Ainsi, le manque d'autophagie peut être létal, principalement durant la privation en nutriment ; et l'excès d'autophagie peut conduire à l'induction de mort cellulaire. Il est donc primordial de réguler très finement ce processus. Les voies majeures de la régulation de l'autophagie sont le complexe mTORC1 et l'AMPK.

a. La voie inhibitrice : mTOR

La kinase mTOR est un acteur majeur dans la perception énergétique de la cellule, dans la régulation de la croissance cellulaire, mais aussi dans la répression de l'autophagie.

Plusieurs signaux, incluant les facteurs de croissance, les acides aminés, le glucose et le statut énergétique sont intégrés par le complexe protéique mTORC (mammalien Target Of Rapamycin Complex). La voie de signalisation de mTOR est constituée de deux complexes fonctionnels : mTORC1 et mTORC2. Ces deux complexes sont impliqués dans la régulation de l'autophagie, toutefois la participation du complexe mTORC1 est actuellement mieux caractérisée.

a1. Le complexe mTORC1 et sa régulation

mTORC1 est un complexe multi-protéique sensible à la rapamycine. Il est composé d'une sous unité catalytique, mTOR, d'une sous unité régulatrice, RAPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR), de la protéine PRAS40 (prolin rich AKT substrate of 40KDa) qui se lie au domaine kinase de mTOR pour supprimer son activité et ce de manière phospho-dépendante et enfin de GBL ou mLST8. De plus, ce complexe est également composé de la protéine Deptor qui, une fois associée à mTOR, permet de réguler négativement ce complexe. L'expression de mTOR est souvent diminuée dans de nombreux types de cancers. Toutefois dans les myélomes multiples, on observe une surexpression de DEPTOR qui est nécessaire au maintien de l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT et à la survie cellulaire (Peterson et al., 2009).

Différentes voies de signalisation peuvent réguler mTORC1. La voie PI3K/AKT, principalement activée suite à la stimulation de récepteur à activité tyrosine kinase, peut activer mTORC1. A l'inverse, les voies GSK3 (si AKT est inactif) et AMPK peuvent l'inhiber. L'induction de l'autophagie par l'inhibition de mTORC1 dans des conditions de privation énergétique est conservée de la levure jusqu'aux mammifères.

a2. mTORC et Autophagie

a1.1. mTORC1

Un des stimuli les plus efficaces pour induire l'autophagie est la déprivation en acides aminés. Dans ces conditions, l'activation de l'autophagie est permise grâce aux RAG GTPases qui existent sous formes d'hétérodimères (RAGA ou RAGB interagissent avec RAGC ou RAGD). Les RAG GTPases sont ancrées à la surface du lysosome par un complexe pentamérique connus sous le nom de complexe Ragulator lequel agit comme une Guanine

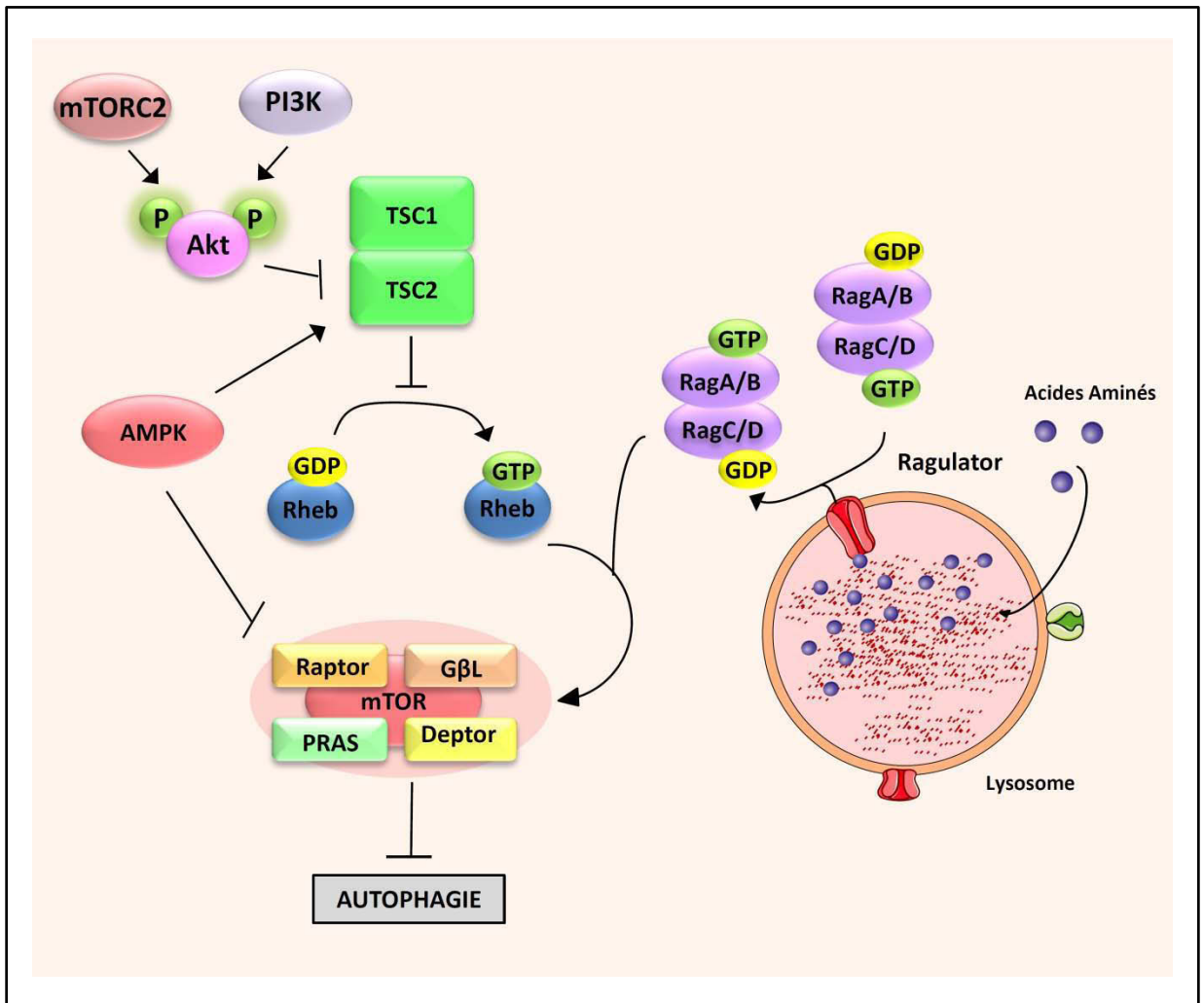


Figure 17: La régulation de mTORC1. Lorsque les nutriments sont abondants, Ragulator en association avec Rheb1 vont activer mTORC1 à la membrane de lysosome. Une fois mTORC1 actif, il régule le métabolisme cellulaire notamment en activant la synthèse protéique et en réprimant le processus autophagique. A l'inverse, lorsque les conditions sont défavorables, l'AMPK est activée, elle active alors le complexe TSC1-TSC2 qui empêche Rheb d'activer mTORC1. L'AMPK peut également inhiber directement le complexe mTORC1 *via* une phosphorylation inhibitrice sur Raptor.

nucléotide exchange factor (GEF) qui active RAGA et RAGB. L'activité du complexe Ragulator est altérée en réponse à des niveaux élevés d'acide aminés. Ainsi, en conditions favorables, les acides aminés sont accumulés dans le lysosome, ce qui va promouvoir l'interaction entre la v-ATPase (vacuolar H⁺ ATPase) et le complexe Ragulator lequel augmente son activité et permet de recruter mTOR à la surface du lysosome. En condition de carence nutritive, période durant laquelle le lysosome est exempt de tout acide aminé, il y a une activation réduite des RAG ce qui induit la libération et l'inactivation de mTOR (Zoncu et al.), (Bar-Peled et al.), (Lamb et al., 2013) (**Figure 17**).

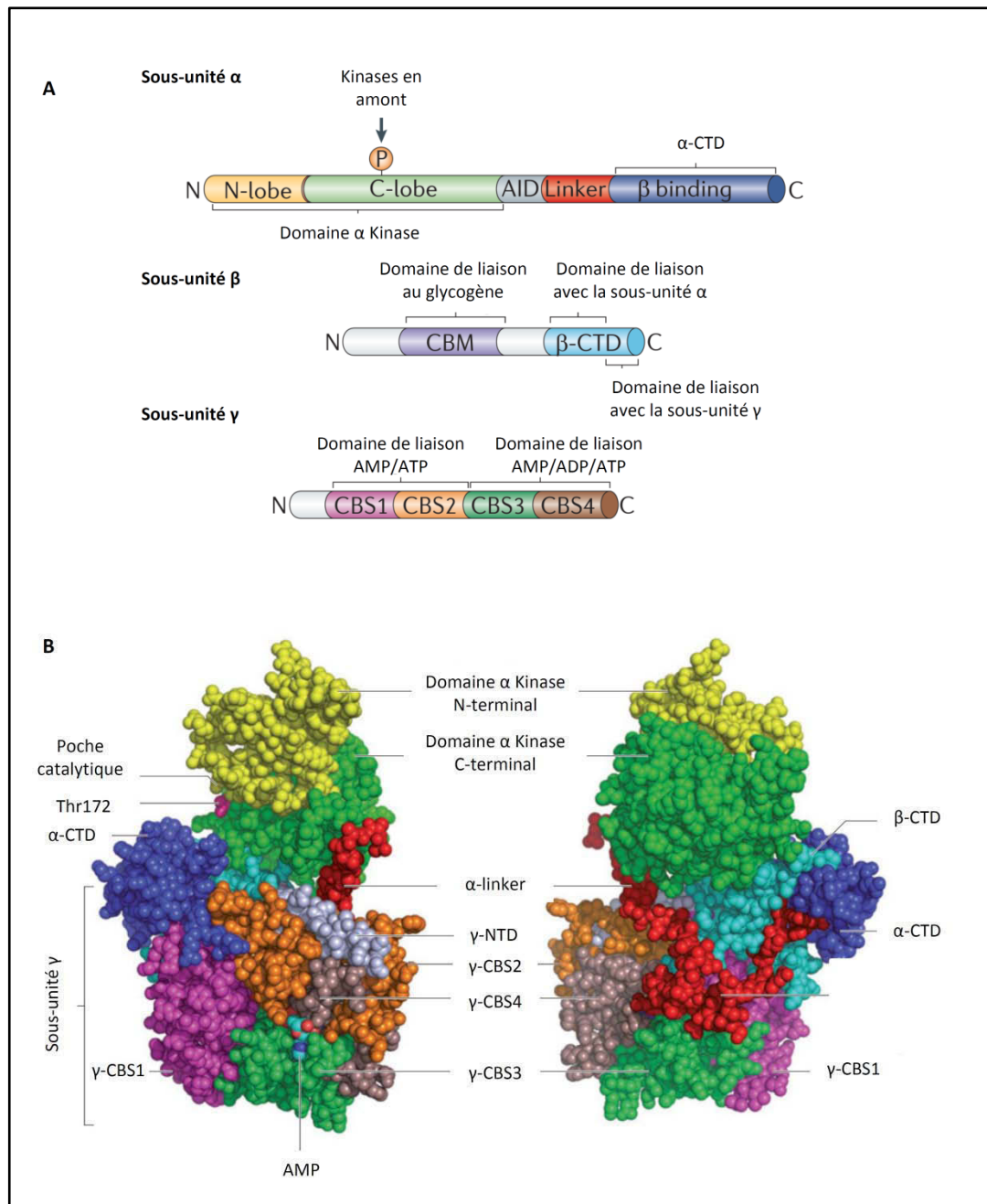
L'activité de mTOR à la surface du lysosome est contrôlée par une seconde petite GTPase membranaire RHEB (RAS Homologue Enriched in Brain). Tout comme mTOR, RHEB est localisé à la surface du lysosome et son activité peut être inhibée par le complexe TSC1-TSC2 (Sancak et al.; Sancak et al., 2008).

Ainsi, en condition de stress, TSC1 et TSC2 forment un complexe protéique fortement phosphorylé (activé) par l'AMPK, qui fonctionne comme une GTPase et inactive Rheb, ce qui réduit l'activité de mTOR. A l'inverse en conditions optimales, les facteurs de croissance bloquent l'activation de TSC1-TSC2 permettant une activation massive de mTORC1. De plus, ces conditions favorisent l'activation d'AKT, qui une fois phosphorylé sur la Ser473 déstabilise le complexe TSC1-TSC2 ce qui abolit l'effet répressif de ce complexe sur mTORC1 (Huang and Manning, 2009), (Long et al., 2005a; Long et al., 2005b).

D'autre part, et de manière dépendante de l'état énergétique de la cellule, mTORC1 peut être associé ou non au complexe initiateur de l'autophagie, ULK1-ATG13-FIP200 et phosphoryler ULK1 et ATG13. En condition de carence énergétique, mTORC1 peut se dissocier du complexe ULK1-ATG13-FIP200 permettant son activation. Ainsi une fois activé, ULK1 s'autophosphoryle et phosphoryle ATG13 et FIP200 ce qui initie l'étape de nucléation (Kamada et al.) (**Figure 13**).

a1.2. mTORC2

mTORC2 est beaucoup moins sensible à la rapamycine que mTORC1 et est composé des protéines Rictor, GBL, PROTOR et SIN1. Même si son rôle régulateur de l'autophagie est moins décrit que celui de mTORC1, l'inhibition de mTORC2 aboutit aussi à l'induction de l'autophagie mais dans des contextes particuliers. Ainsi, mTORC2 en phosphorylant AKT peut contribuer à l'activation de kinases importantes pour la survie cellulaire. Cette



Hardie *et al.*, 2012

Figure 18: Structure de la protéine AMPK. (A) L'AMPK est une protéine hétérotrimétique composée de 3 sous-unités (α , β , et γ). Le domaine C-terminal de la sous-unité β (β -CTD) forme le noyau du complexe, en se liant à la fois au domaine C-terminal de la sous-unité α et au domaine N-terminal en amont du CBS1 de la sous-unité γ . **AID**, Auto-Inhibitory Domain; **CTD**, Carboxyl-Terminal Domain, **NTD**, Amino-Terminal Domain, **CBM**, Carbohydrate-Binding Module, **CBS** Cystathionine β -Synthetase, séquences répétées dans la sous-unité γ . **(B)** Deux vues d'une structure cristalline d'un complexe hétérotrimérique partielle de l'AMPK de mammifère. La vue de droite est tournée d'environ 180° autour de l'axe des ordonnées par rapport à la vue de gauche.

phosphorylation a pour conséquence de diminuer l'expression du facteur de transcription FoxO3 qui est impliqué dans l'expression de nombreux gènes régulant l'autophagie (*atg12L*, *lc3b*, *bnip3l* ou *gabarap1*) (Mammucari et al., 2008).

De manière intéressante, alors que mTOR est inhibé durant les stades précoces de l'induction de l'autophagie, de longues périodes de carence nutritive mènent à la réactivation de mTOR en améliorant la production de nutriment (principalement des acides aminés) par l'autophagosome (Yu et al.).

Enfin, en plus de ce rôle inhibiteur de l'autophagie, mTOR peut de concert, phosphoryler et inhiber la protéine DAPK1, un répresseur de l'autophagie et ainsi promouvoir l'augmentation du processus (Koren et al.).

b. La voie activatrice : AMPK

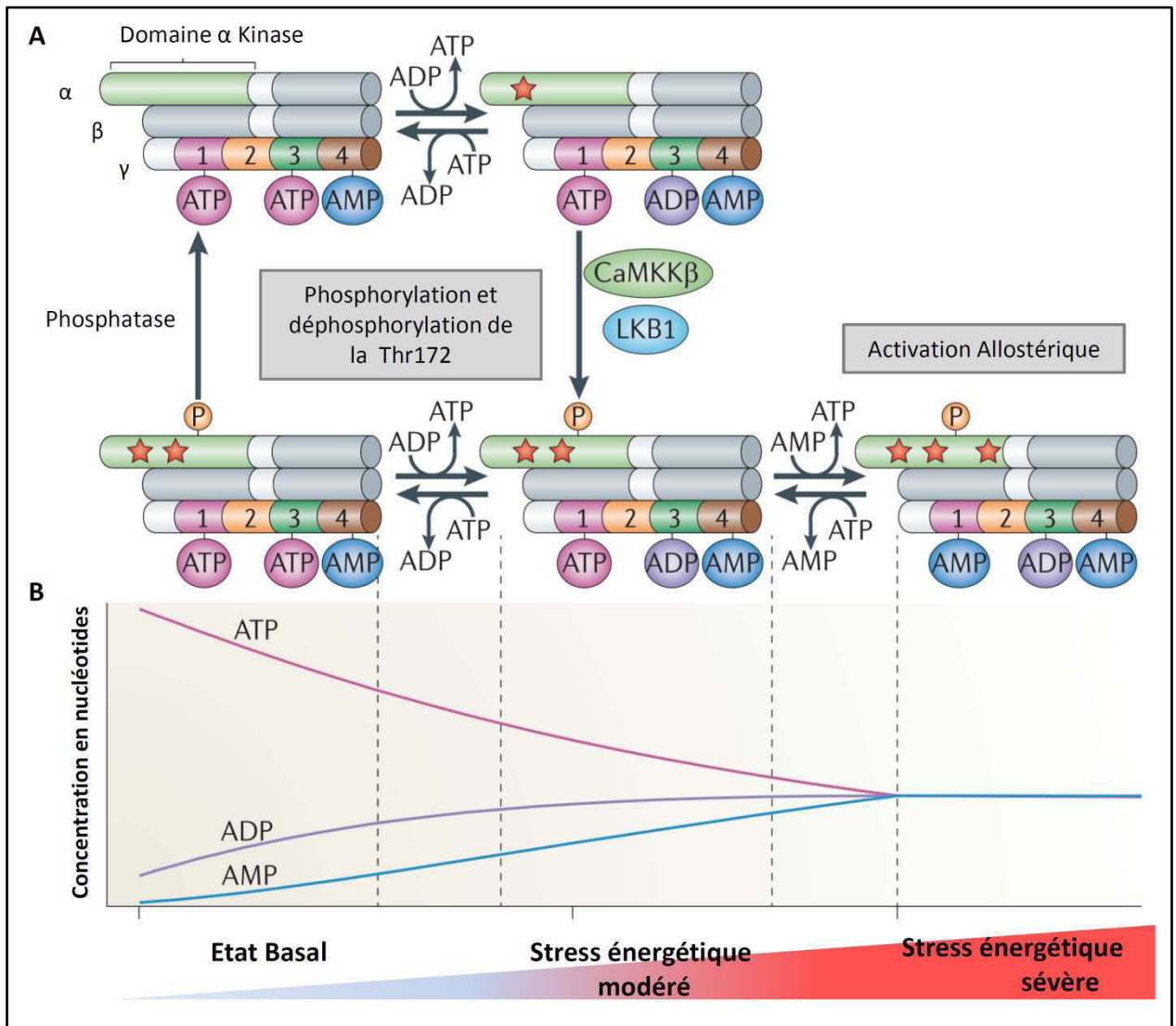
b1. La composition du complexe AMPK

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous unité catalytique α , associée à deux sous unités régulatrices β et γ . Chez les mammifères, chaque sous unités présentes de multiples isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) codées par des gènes distincts (Hardie et al.) (**Figure 18**).

La sous unité α , possède 4 domaines α -KD, α -AID, un domaine linker et α -CTD. Le domaine Kinase (α -KD) composé de deux poches de phosphorylation et est localisé en N-terminal. Ce domaine contient la Thr172, site de phosphorylation permettant l'activation de l'AMPK par ses kinases régulatrices. Il est immédiatement suivi de α -AID (auto inhibitory domain), un petit domaine inhibiteur de l'AMPK. Il est nommé ainsi car sa délétion augmente légèrement l'activité de l'AMPK. Le C-terminal de α -AID marque la frontière entre la partie catalytique et la partie liant les nucléotides formant le linker avec la partie suivante. Enfin, la partie C-terminale de la sous unité α (α -CTD)

La sous unité β contient 2 domaines globulaires conservés : β -CBM (β carbohydrate binding domain) et β -CTD (β C terminal Domain).

Le domaine β -CMB permet la liaison avec les molécules de glycogène, alors que le domaine β -CTD interagit avec le α -CTD et la sous unité γ pour former le cœur de l'hétérotrimère.



Hardie *et al.*, 2012

Figure 19: Modèles de mécanismes d'activation de l'AMPK. (A) Ce modèle représente les différents états des trois sous-unités de l'AMPK. L'AMPK est activée par l'augmentation des concentrations d'AMP et d'ADP cellulaire. A l'état basal (en haut à gauche), les sites 1 et 3 de la sous-unité- γ sont occupés par l'ATP (le site 4 est toujours occupée par l'AMP). En condition de stress modéré (en haut au centre), le remplacement de l'ATP par ADP (ou AMP) sur le site 3 induit la phosphorylation de Thr172 (en bas au centre), provoquant une augmentation de l'activité de l'AMPK (indiqué par deux étoiles). Enfin en conditions de stress énergétique élevé, le remplacement de l'ATP par l'AMP au site 1 provoque l'activation allostérique (indiqué par une troisième étoile, en bas à droite) et décuple ainsi l'activité kinase de l'AMPK. Quand le statut énergétique cellulaire revient à la normal, l'AMP au site 1 et l'ADP ou l'AMP sur le site 3 sont progressivement remplacés par l'ATP (déplaçant de droite à gauche sur la rangée du bas). Cela favorise la déphosphorylation de Thr172 et induit un retour à l'état basal. **(B)** Le graphique représente les changements de concentrations en l'ATP, ADP et AMP en fonction du stress énergétique cellulaire.

Concernant le rôle de la sous unité β , il est décrit que sa myristylation est requise pour la phosphorylation de la Thr172 et donc pour l'activation de l'AMPK. (Oakhill et al.)

La sous unité γ contient 4 séquences en tandem, nommées CBS1 à CBS4 pour cystathione β -synthetase. Elles permettent l'obtention de 4 potentielles poches de fixation de nucléotides (adénosine). Chez les mammifères, CBS2, n'est jamais occupé et le site CBS4 est toujours lié à une molécule d'AMP. Quant aux deux sites restants, CBS1 et CBS3, ce sont des sites de fixation de l'AMP, de l'ADP ou de l'ATP. Dans des conditions physiologiques, les ratios ATP/ADP sont élevés, les sites CBS1 et CBS3 sont principalement occupés par de l'ATP. A l'inverse, en conditions de stress, les concentrations d'ADP et d'AMP augmentent et remplacent progressivement l'ATP dans les sites CBS1 et CBS3. La liaison de l'AMP à CBS1 semble être responsable de l'activation allostérique de l'AMPK alors que la liaison de l'AMP ou de l'ADP à CBS3 semble moduler l'état de phosphorylation de la Thr172. (Xiao et al.) **(Figure 19).**

b2. La Régulation de l'activation de l'AMPK

Le ratio ATP/AMP est un reflet du niveau énergétique intracellulaire, l'AMP et l'ATP étant capables de réguler de manière opposée l'activité de l'AMPK. L'AMP se lie de façon allostérique à la sous-unité γ de l'AMPK permettant de promouvoir la phosphorylation et d'empêcher la déphosphorylation de la Thr172. Bien que l'ADP ne puisse pas activer de façon allostérique l'AMPK, il est néanmoins capable de se lier à cette dernière et de permettre sa phosphorylation sur la Thr172 (Hardie, 2007). L'AMPK est une kinase très conservée au cours de l'évolution probablement parce qu'elle joue un rôle majeur dans le métabolisme cellulaire. Lors d'un stress métabolique, où lorsque la concentration en ATP cellulaire est faible, l'AMPK est activée, afin d'induire le catabolisme cellulaire pour produire de l'énergie. C'est à ce titre que l'AMPK est liée à l'autophagie.

L'implication de l'AMPK (SNF1) dans la régulation de l'autophagie a été initialement identifiée chez la levure. (Wang et al., 2001) Dans les cellules de mammifère, le rôle de l'AMPK dans le catabolisme n'a été mis en évidence que très récemment par les travaux de Meley en 2006. (Meley et al., 2006). Ainsi l'expression d'un mutant dominant négatif de l'AMPK inhibe totalement l'autophagie induite par de l'HBSS (mimétique de la carence nutritive) dans les cellules HT-29 et les cellules HeLa. *A contrario*, la transfection dans ces

mêmes cellules, par une forme constitutive active de l'AMPK n'affecte aucunement l'autophagie basale de la cellule. Ainsi, même s'il n'est pas encore certain que seule l'activation de l'AMPK soit suffisante pour induire l'autophagie, elle est toutefois essentielle à ce processus.

Outre son activation allostérique dépendante des ratios d'ATP/AMP cellulaire, il existe d'autres moyens de réguler l'AMPK. Cette régulation est permise grâce à la phosphorylation par des kinases d'un résidu très conservé, la thréonine T172 présente sur la sous unité α de l'AMPK. A ce jour, 3 kinases ont été décrites comme capables d'activer l'AMPK.

LKB1 (Liver Kinase B1) ou STK11 est une sérine thréonine Kinase de 50 KDa, qui fut identifiée en 1998, comme un suppresseur de tumeur muté (facteur héréditaire) dans le syndrome de Peutz Jeghers. Ce n'est que 5 ans plus tard, que son rôle de kinase régulatrice de l'AMPK a été découvert (Hawley et al., 2003), (Woods et al., 2003).

Même si LKB1 est la principale kinase en amont de l'AMPK, elle n'est pas la seule. En effet, certaines cellules tumorales comme les cellules HeLa n'expriment pas LKB1 et pourtant il a été observé que l'AMPK peut toujours être phosphorylée sur la thréonine T172 et activée en réponse à des ionophores calciques (Woods et al., 2005). Ces observations ont abouti à la découverte des CaMKK (Ca^{2+} calmodulin-dépendant kinase kinases) et plus particulièrement de la CaMKK β (CaMKK2) qui est un régulateur important de l'AMPK, puisqu'elle est capable de phosphoryler la thréonine T172 de l'AMPK. Cette activation de l'AMPK par la CaMKK β est retrouvée dans des conditions physiologiques, notamment au cours de l'activation des lymphocytes T par un antigène (Tamas et al., 2006), lors de la dépolarisation des neurones de l'hippocampe (Hawley et al., 2005), ou encore lors du traitement de certains types cellulaires avec des agonistes de RCPG (via Gq/G11) conduisant à la formation d'IP3 et de flux calciques intracellulaires (Stahmann et al., 2006).

Enfin il existe une dernière kinase décrite en amont de l'AMPK, TAK1 (TGF β activated Kinase 1). En effet, un criblage chez la levure a pu mettre en évidence que TAK1, membre de la famille de MAPKKK, était capable de phosphoryler et d'activer SNF1, l'homologue de l'AMPK chez la levure (Momcilovic et al., 2006). Par la suite Herrero Martin *et al.*, ont démontré dans une lignée de cellules épithéliales du sein, qu'un traitement par TRAIL, membre de la famille du TNF, est capable d'induire un processus autophagique co-induit par l'activation de l'AMPK et la répression de mTOR et ce, indépendamment de LKB1 et de CaMKK β . Ces

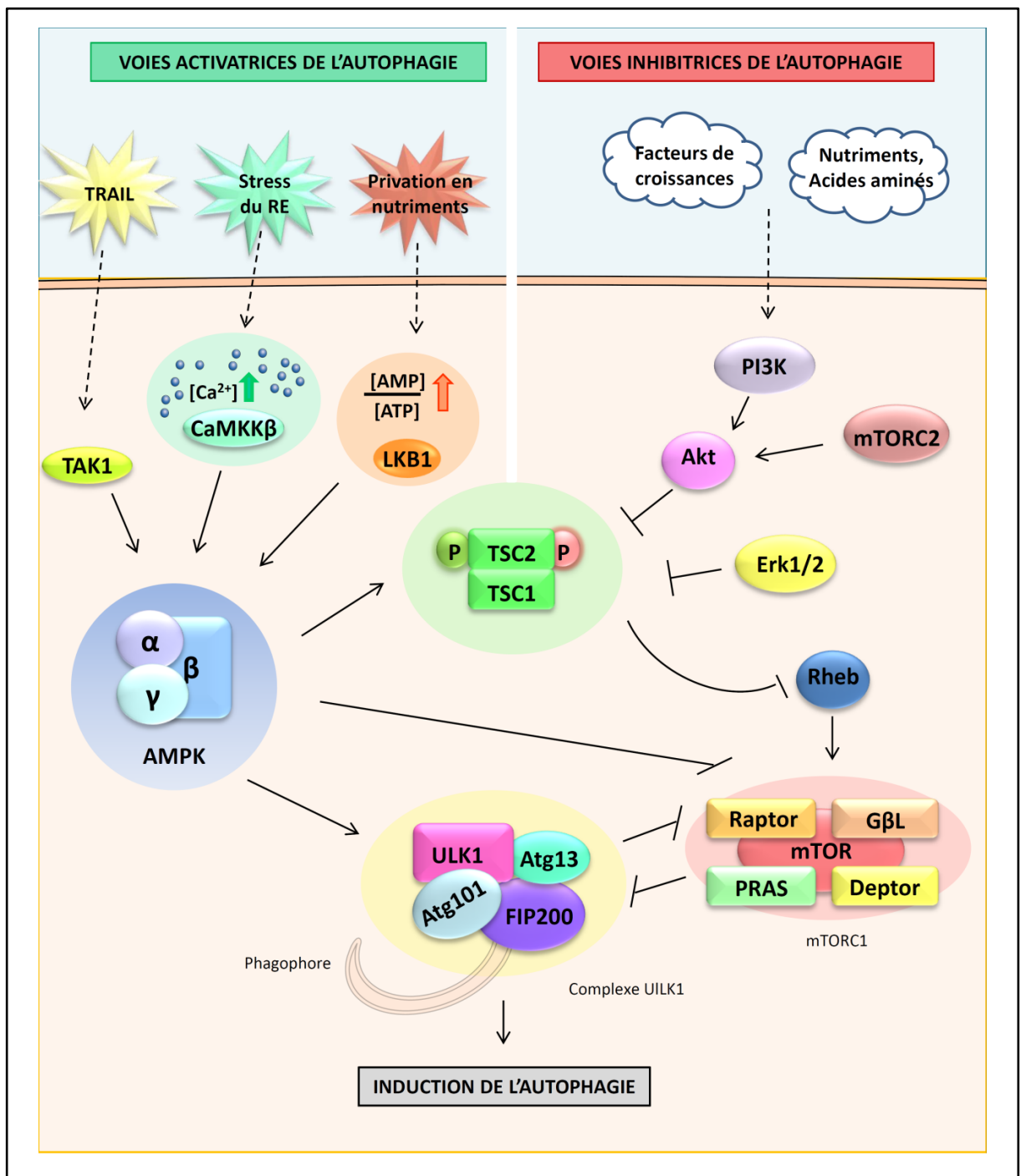


Figure 20: Les voies de régulation positives et négatives de l'autophagie. Les voies AMPK et mTORC1 sont les voies majeures de la régulation de l'initiation de l'autophagie. L'activation de l'AMPK par les kinases TAK1, CaMKKβ ou encore LKB1, permet d'initier l'autophagie. En étant actif, l'AMPK induit l'activation du complexe TSC, formé de TSC1 et de TSC2. Ce complexe est le principal inhibiteur de mTORC1. Il est au carrefour des voies de signalisation activatrices (AMPK) et inhibitrices de l'autophagie (Akt, ERK...). Les voies activatrices vont phosphoryler positivement TSC2 alors que les voies inhibitrices vont phosphoryler négativement TSC2 pour stimuler mTORC1.

résultats suggèrent que TRAIL pourrait lui aussi jouer un rôle dans l'activation de l'AMPK par TAK1. (Herrero-Martin et al., 2009)

b3. AMPK et la régulation de l'Autophagie.

L'AMPK permet de réguler positivement l'autophagie grâce à son effet inhibiteur sur mTOR. Il existe deux mécanismes de régulation de l'activité de mTOR par l'AMPK (**Figure 20**).

Le premier, en réponse à une déprivation en nutriment ou lorsque les niveaux d'AMP sont élevés, l'AMPK activée va promouvoir l'activation du complexe TSC1-TSC2 (Tuberosclerosis complex 1- Tuberosclerosis complex 2). TSC1 stabilise TSC2 ce qui le protège de sa dégradation par le protéasome. TSC2 agit comme une GAP (GTPase Activated Protein) sur Rheb, une petite GTPase requise pour l'activation de mTOR. Ainsi, lorsque le complexe TSC1-TSC2 est activé par l'AMPK, il est capable d'inactiver mTORC1 en stimulant la conversion de Rheb-GTP (active) en Rheb-GDP (inactive) (*cf.* partie mTOR (II-B.4.a1.))

Le second mécanisme est une phosphorylation inhibitrice de mTORC1 par l'AMPK. L'AMPK phosphoryle, Raptor (un composant de mTORC1) sur les sérines S722 et S792. Ces phosphorylations inhibent l'activité kinase de mTORC1, sans pour autant affecter l'association mTOR-RAPTOR. Une fois, mTORC1 inhibé, le processus autophagique peut être induit (Gwinn et al., 2008).

D'autre part, dans certains cas de mitophagie induite par la déprivation en acides aminés ou par une carence en glucose, ULK1 peut aussi directement être activé par l'AMPK sur sa sérine S555. Cette activation conduit directement à la mise en place de l'autophagie ce qui est corrélé à une diminution de la phosphorylation des substrats de mTOR, indiquant donc l'existence d'un retro contrôle de négatif de l'axe AMPK-ULK1 sur l'activation de mTOR (Alers et al.).

Enfin, il a été récemment démontré que dans des conditions de déprivation en glucose, l'AMPK est capable de réguler les différents complexes contenant PI3KC3. De cette manière, l'AMPK inhibe les complexes PI3KC3 couplés aux régulateurs négatifs de l'autophagie tels que ceux formés avec Rubicon ou Bcl-2. De plus, l'AMPK peut phosphoryler PI3KC3 sur sa thréonine T163 et sa sérine S165 ce qui augmente l'activité kinase des complexes PI3KC3 associés aux membres pro-autophagiques. Ces complexes formés par son association avec

Gènes invalidés	Phénotype
<i>Atg3, Atg5, Atg7, Atg9, Atg16L1</i>	Létalité postnatale avec niveau réduit d'acides aminés dans le plasma, (Atg9 a un rôle additionnel dans la réponse immunitaire innée induite par l'ADN double brin)
<i>Beclin1</i>	Létalité embryonnaire précoce (max E7.5), Tumeurs spontanées chez les souris Beclin1 ^{+/-}
<i>FIP200</i>	Létalité embryonnaire précoce (E13.5-E16.5) liée à des défauts dans le développement du cœur et du foie
<i>Ambra1</i>	Létalité embryonnaire précoce (E13.5-E16.5) à cause des défauts dans le développement du tube neural et une hyperprolifération des tissus nerveux
<i>ULK1</i>	Augmentation du nombre de réticulocytes présentant des défauts de clearance mitochondriale
<i>Atg4C</i>	Viable, fertile, augmente le risque de fibrosarcome carcinogène
<i>LC3B, GABARAP</i>	Phénotype normal

Mizushima and Levine, 2010

Tableau 4: Effets de l'invalidation ubiquiste chez la souris des protéines ATG. Ce tableau énumère les phénotypes des souris invalidées pour des protéines ATG. Nous constatons, de manière générale, que les protéines ATG sont essentielles au cours des étapes les plus précoces du développement embryonnaire et à la naissance des souriceaux.

UVRAG et ATG14 vont permettre la phosphorylation de Beclin1 sur la sérine S91 et la S94 permettant ainsi l'induction de l'autophagie. (Kim et al.)

5. Fonctions physiologiques de l'Autophagie

a. Activation catabolique basale nécessaire à l'homéostasie cellulaire et tissulaire

La séquestration et la dégradation des agrégats intracellulaires et des organelles permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire y compris en conditions basales. L'autophagie recycle les composants séquestrés pour produire l'énergie nécessaire à la synthèse de macromolécules pour la survie cellulaire. L'activité autophagique peut être accrue en réponse à des stimuli intra ou extracellulaires. C'est un mécanisme essentiel grâce auquel les organismes vivants peuvent s'adapter en réponse à des stress métaboliques. Cependant toutes les cellules ont une autophagie basale constitutive afin de permettre le maintien de l'homéostasie grâce au recyclage des protéines et des organelles. Le rôle de cette autophagie basale a été élucidé grâce aux différents modèles murins où l'autophagie a été délétée dans différents tissus (**Tableau 4 et Tableau 5**).

De cette manière, l'autophagie a été démontrée comme indispensable pour le maintien de la fonction hépatique. En effet, l'extinction d'*atg7* conduit au développement d'une hépatomégalie caractérisée par l'accumulation d'organelles atypiques associée à d'autres symptômes spécifiques de la maladie tels que l'accumulation d'inclusion d'ubiquitine et la mort des hépatocytes (Komatsu et al., 2005).

Toujours au niveau de la régulation métabolique, l'inactivation de l'autophagie dans les cellules β -pancréatiques conduit à une diminution de la tolérance au glucose qui se traduit par une sécrétion insuffisante d'insuline lors de la prise de glucose et une augmentation substantielle de la mort des cellules β en réponse à un régime riche en graisse (Jung et al., 2008).

D'autre part, l'autophagie basale est aussi essentielle au maintien de l'intégrité des tissus musculaires. L'inhibition de l'autophagie dans les muscles squelettiques conduit à une atrophie et à une faiblesse musculaire qui récapitulent les caractéristiques morphologiques de la myopathie (Masiero et al., 2009). Au niveau du muscle cardiaque, la déficience en

Gènes invalidés	Tissu ou cellules cibles	Phénotype majeur
Atg5	Cardiomyocytes	Défaillance et Hypertrophie cardiaque Accumulation d'ubiquitine, p62 et des mitochondries
	Muscles squelettiques	Atrophie des fibres musculaires rapides Accumulation d'ubiquitine et p62
	Ovocytes	Létalité embryonnaire au stade 4-8 cellules si fécondé avec un spermatozoïde <i>atg5</i> ^{-/-}
	Cellules B	Diminution du nombre de cellules B
	Cellules dendritiques	Défauts de présentation des antigènes Forte mortalité due aux infections virales
	Podocytes	Sclérose des glomérules chez la souris âgée Accumulation des agrégats protéiques ubiquitinés et associés à p62
Atg7	Cellules hématopoïétiques	Sévères anémies Lymphopénies T et B, Accumulation de mitochondries
	Adipocytes	Diminution de la masse adipeuse blanche, Résistant à l'obésité ; Accumulation d'ubiquitine, p62 et des mitochondries
	Cellules β-pancréatiques	Fonctions et nombre diminués ; Accumulation d'ubiquitine, p62 et des mitochondries
	Cellules hématopoïétiques	Sévères anémies ; Lymphopénies T et B Accumulation de mitochondries
Atg5 ou Atg7	Cellules neurales	Neurodégénérescence Accumulation d'ubiquitine et de p62
	Cellules T	Diminution du nombre de cellules T matures Accumulation de mitochondries
	Cellules de Purkinje	Dégénérescence axonale ; Accumulation de p62
	Hépatocytes	Défauts hépatique, hépamégalie Accumulation d'ubiquitine, p62 et des mitochondries
FIP200	Cellules neurales	Neurodégénérescence Accumulation d'ubiquitine et de p62

Mizushima and Levine, 2010

Tableau 5: Effets de l'inactivation spécifique de l'autophagie dans certains organes. La génération de modèles invalidés pour *atg5*, *atg7* ou encore FIP200 spécifiquement dans certains tissus ou types cellulaires a globalement révélé que l'absence d'autophagie aboutit à des défaillances fonctionnelles de la cellule.

autophagie conduit à une hypertrophie du cœur, une dilatation ventriculaire et des dysfonctionnements contractiles. A long terme, ces dysfonctionnements induisent des cardiomyopathies caractérisées par une augmentation du diamètre ventriculaire droit accompagnée d'une désorganisation de la structure des sarcomères et des mitochondries collapsées (Taneike et al.).

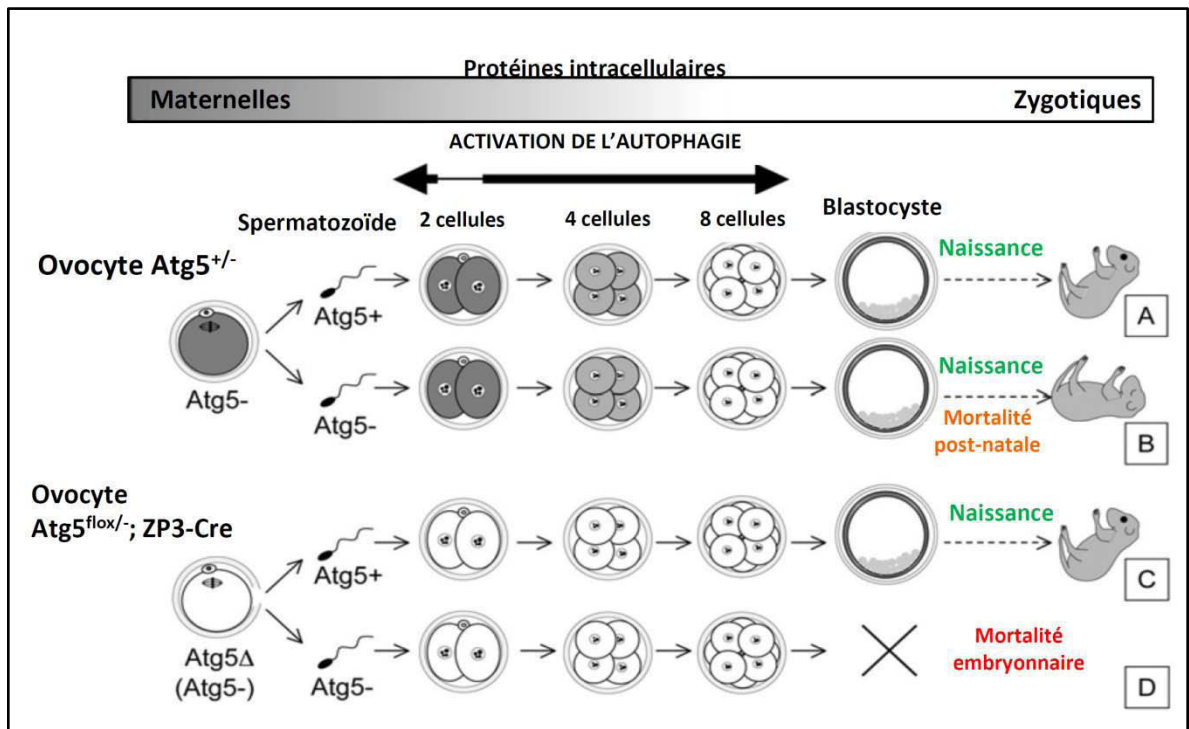
De plus, la voie autophagique semble avoir une importance vitale pour l'hématopoïèse puisque son extinction dans les lymphocytes T conduit à une lymphopénie sévère résultant de l'apoptose des CD4⁺ et CD8⁺ à la suite de dommage à la mitochondrie. La lymphopénie n'est pas la seule conséquence d'une autophagie déficiente dans les lymphocytes T, puisque la présentation antigénique est aussi altérée. De la même manière, l'absence d'autophagie dans les cellules dendritiques empêche l'exposition correcte des peptides antigéniques par le CMHII ce qui a pour conséquence une altération de l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

Enfin, les souris invalidées pour l'autophagie dans le compartiment hématopoïétique sont plus sujettes aux développements de colites aiguës et de la maladie de Crohn, ce qui est probablement la conséquence des altérations de la sécrétion des cytokines inflammatoires par les macrophages (cellules de Paneth) (Saitoh et al., 2008).

Enfin, lorsque la formation de l'autophagosome est imparfaite, l'accumulation importante d'organelles endommagées et d'agrégats protéiques interfère avec les fonctions cellulaires et peut conduire à la dégénérescence puis la mort de la cellule. (cf. Partie Implication de l'autophagie dans les pathologies (II-B.6))

b. Implication de l'autophagie au cours du développement et de la différenciation cellulaire

Comme mentionné précédemment, l'autophagie est un mécanisme de survie cellulaire qui intervient lors de période de stress énergétique. Cette «autophagie nutritionnelle», inhibée par les acides aminés, s'oppose à la mise en place d'un programme d'apoptose. Cette autophagie est vitale pour la levure qui ne peut survivre à une privation en nutriments sans la mise en place de ce processus. En dépit de son rôle crucial dans la survie cellulaire, la génération de modèles murins invalidés pour certains gènes *atg* a également permis des avancées majeures dans la compréhension du rôle de l'autophagie au cours du développement de l'organisme et de la différenciation cellulaire.



Tsukamoto *et al.*, 2008

Figure 21: Défauts du développement des embryons invalidés pour l'autophagie. (A) Les ovocytes *Atg5-null* (contenant les protéines *Atg5* maternelles, indiquées en gris) provenant de la femelle *atg5^{+/-}*, se développent normalement s'ils sont fécondés par un spermatozoïde WT pour *Atg5*. (B) Ces ovocytes se développent normalement même s'ils sont fécondés par un spermatozoïde *Atg5-null*. (D) Cependant, les ovocytes (sans les protéines *Atg5* maternelles) provenant d'ovocyte de maternel déficient pour *atg5* ne sont pas capables de se développer au delà des stades 4 à 8 cellules s'ils sont fécondés par un spermatozoïde *atg5-null*. (C) Toutefois, ils peuvent se développer normalement s'ils sont fécondés avec du sperme sauvage pour *atg 5*. Δ indique que l'allèle floxé a été réarrangé avec succès par la recombinaise Cre.

b1. Autophagie et développement

Les principaux travaux ayant mis en évidence l'importance de l'autophagie au cours du développement sont ceux issus du laboratoire du Dr. Noburu Mizushima. Ainsi, il a été déterminé que chez les mammifères, l'autophagie est primordiale lors de la transition de l'ovocyte en embryon mais également pour la survie des nouveaux nés lors des premières heures après la naissance (Tsukamoto et al., 2008a) , (Kuma et al., 2004) (**Figure 21**).

b1.1. La transition Ovocyte/Embryon

Durant l'ovogénèse, les ovocytes accumulent des protéines maternelles nécessaires à leur développement et à leur survie. Or, après la fécondation, ces protéines maternelles doivent être dégradées et la synthèse de nouvelles protéines propres aux zygotes doit être assurée (Stitzel and Seydoux, 2007). Ce processus bien connu lors de la transition de l'ovocyte en embryon se produit en même temps que d'autres changements, incluant la dégradation des ARN maternels, la synthèse de nouveaux ARN zygotiques et la réorganisation des organelles. Bien qu'une partie des protéines soit dégradée par le protéasome, l'autophagie semble également importante dans le catabolisme des protéines d'origine maternelle qui entravent la maturation de l'ovocyte fécondé. La mise en évidence de l'autophagie au cours de la transition ovocyte/embryon a pu être démontrée grâce à des expériences de fécondation *in vitro* d'ovocytes murins exprimant une forme de LC3 couplée à la GFP. Ainsi, dans les 4h suivant la fécondation, une forte accumulation de puncta traduisant l'induction du processus autophagique est observée (Tsukamoto et al., 2008b). Parallèlement à l'apparition de puncta de LC3, les protéines S6K et 4EBP1, des substrats de mTOR (régulateur négatif de l'autophagie), sont fortement déphosphorylées, confirmant l'induction de l'autophagie après la fécondation. Pour analyser la relevance fonctionnelle de l'autophagie durant l'embryogénèse précoce, l'équipe du Dr. Mizushima a croisé des souris *atg5^{flox}* avec des souris Zp3-CRE, un transgène actif uniquement au cours de l'ovogénèse. Ce croisement a ainsi permis d'obtenir des souris dont les ovocytes sont totalement dépourvus en ARN codant pour *atg5* y compris maternels. Dans ce contexte, l'absence d'autophagie cause un arrêt du développement embryonnaire au stade 4-8 cellules, conduisant à une létalité embryonnaire (de Vries et al., 2000).

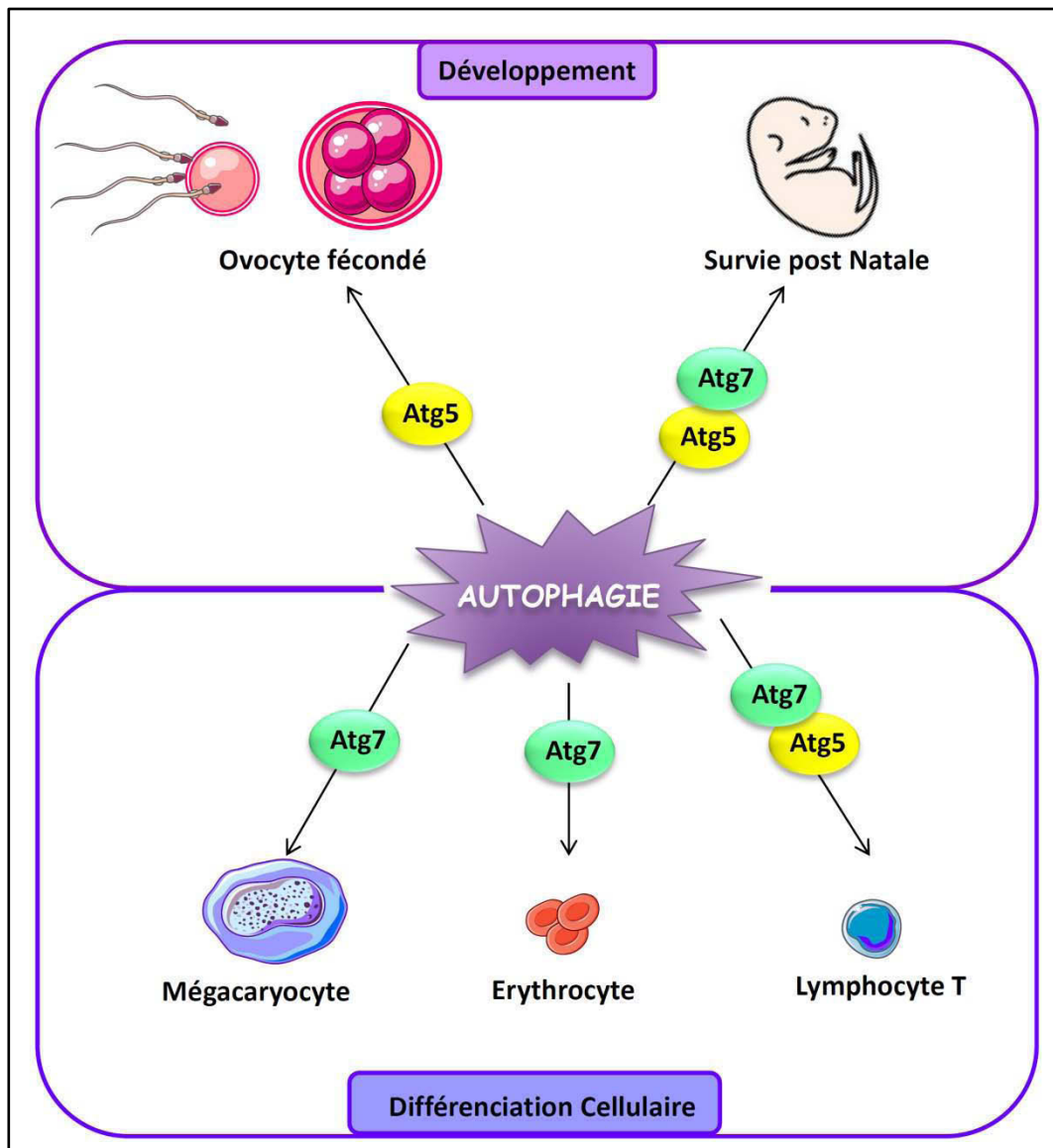


Figure 22: Le rôle de l'autophagie dans le développement et la différenciation cellulaire chez les mammifères. Grâce à la génération de modèles murins invalidés pour les protéines Atg5 et Atg7, l'autophagie a été démontré comme essentielle lors du développement embryonnaire et lors de processus de différenciation cellulaire. L'autophagie joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire. Elle est impliquée dès la fécondation de l'ovocyte, jusqu'aux premiers jours de la naissance où elle permet la production en acides aminés nécessaires à la survie des nouveau-nés (panel du haut). L'Autophagie est également importante dans les processus de différenciation cellulaire, où elle permet notamment l'élimination des mitochondries comme au cours de la différenciation lymphocytaire et des érythrocytaire (panel du bas)

B1.2. La survie Post-Natale

A la naissance, l'apport de nutriments trans-placentaire est soudainement interrompu et les nouveaux nés sont exposés à une sévère restriction nutritive jusqu'à ce qu'ils soient nourris du lait maternel. L'équipe de Mizushima montrent que les nouveaux nés s'adaptent à cette condition de stress calorique grâce à la mise en place du processus autophagique (Kuma et al., 2004). Ainsi, juste après la naissance, l'autophagie est immédiatement induite dans différents tissus (myocarde, diaphragme, poumons). Elle est activée dès 30 minutes et est fortement maintenue pendant 3h à 12h, puis elle retourne à un niveau basal après 1 à 2 jours. Les souris déficientes pour *atg5* ne survivent qu'un jour après leur naissance. En effet, les nouveaux nés *atg5*^{-/-} présentent des concentrations d'acides aminés anormalement bas dans leur plasma et dans leurs tissus et souffrent très rapidement d'insuffisance systémique en acides aminés. De plus, comparées aux souris contrôle, les souris *atg5*^{-/-} ont une forte activation de l'AMPK qui peut être inhibée par apport de lait, confirmant que l'activation de l'AMPK dans ce contexte est bien due à une carence nutritive. Cette étude suggère que la production d'acides aminés obtenue grâce au processus autophagique, permet le maintien de l'homéostasie énergétique essentielle à la survie des nouveaux nés.

b2. Autophagie et Différenciation Cellulaire

A l'instar de l'activation des caspases, l'induction de l'autophagie est maintenant très largement décrite comme cruciale dans la mise en place d'un certain nombre de programmes de différenciation (Droin et al., 2009). Ainsi, une autophagie fonctionnelle est décrite comme nécessaire au bon déroulement de la différenciation des érythrocytes, des mégacaryocytes, des monocytes, et des lymphocytes (**Figure 22**).

b2.1. La Différenciation Erythrocytaire

La différenciation érythrocytaire, ou érythropoïèse, permet l'obtention de réticulocytes matures (globules rouges) à partir des précurseurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse. Au cours des derniers stades de l'érythropoïèse, l'érythroblaste perd son noyau, et dégrade un grand nombre de ses organelles et une partie des protéines pour

devenir un réticulocyte mature, petite cellule uniforme et biconcave permettant le transport de l'oxygène. Cette énucléation est bien décrite et nécessite l'intervention des caspases (Zermati et al., 2001). A la fin des années 2000, et à l'inverse des mécanismes d'énucléation, les procédés impliqués dans la dégradation des organelles et notamment des mitochondries au cours de la différenciation érythrocytaire restaient encore à découvrir. En 1966, le Dr. Geoffrey Kent avait pourtant d'ores et déjà observé en microscopie électronique la présence de vacuoles autophagiques séquestrant du réticulum endoplasmique et des mitochondries lors de la différenciation érythrocytaire sans pour autant démontrer la nécessité de l'autophagie au cours de cette différenciation (Kent et al., 1966). Finalement, ce n'est qu'en 2008 que l'équipe du Dr. Wang aux Etats-Unis démontre l'importance de BNIP3L, une protéine faisant partie de la famille de Bcl-2, dans l'élimination des mitochondries (Sandoval et al., 2008). En effet, les souris déficientes pour *Nix*^{-/-} (homologue murin de BNIP3L chez l'homme) présentent des défauts importants dans la dégradation des mitochondries au niveau des réticulocytes sans que l'élimination des ribosomes ou l'énucléation ne soient affectées. D'autre part, les mitochondries issues des souris invalidées pour *Nix* ne présentent aucune perte de potentiel membranaire pourtant indispensable à l'induction de la mitophagie et à leur séquestration dans l'autophagosome. (Schweers et al., 2007) Cette absence de dégradation des mitochondries par mitophagie dans les souris *Nix*^{-/-} conduit à une sévère anémie qui est compensée par une accumulation de précurseurs érythrocytaires. L'implication de l'autophagie dans la maturation terminale des érythrocytes a pu être également confirmée grâce la génération de modèles murins invalidés pour certains gènes clés de l'autophagie tels que *ULK1* ou *ATG7*. Ainsi, les souris *ULK1*^{-/-} présentent une forte accumulation dans le sang de réticulocytes immatures non fonctionnels. (Kundu et al., 2008) Le défaut de fonctionnalité de ces réticulocytes est lié à l'absence d'élimination des ribosomes et des mitochondries par autophagie. Plus récemment, l'équipe du Dr. Anna Katharina Simon a généré un modèle murin invalidé pour *ATG7* spécifiquement dans le système hématopoïétique (*vav-atg7*) et ceci afin d'étudier le rôle de l'autophagie dans l'hématopoïèse et plus précisément au cours de l'érythropoïèse. (Mortensen et al.) Ainsi les souris *vav-atg7*^{-/-} sont fortement anémiques et meurent 8 à 14 semaines après leur naissance. Leurs érythrocytes présentent une accumulation spécifique de mitochondries endommagées conduisant à une mortalité cellulaire prématurée. L'absence d'induction de mitophagie dépendant d'ATG7 conduit à une accumulation de mitochondries au stade

érythroblaste dans la moelle et se poursuit jusqu'au stade du réticulocyte dans le sang périphérique suggérant que la mitophagie débute dès l'énucléation des érythroblastes. A l'inverse des souris invalidées pour *ULK1*, mais similairement aux souris invalidées pour *Nix*, les érythrocytes *atg7* déficients ne semblent pas accumuler d'autres organelles en plus des mitochondries. Cette observation suggère l'existence de voies de « digestion » alternatives à l'autophagie pour éliminer les organelles.

b2.2. La Différenciation Mégacaryocytaire

La mégacaryocytopoïèse est le processus menant à la production de plaquettes grâce à la prolifération et la différenciation de précurseurs mégacaryocytaires médullaires. Les mégacaryocytes ont un procédé unique de maturation qui inclut une phase proliférative des précurseurs mégacaryocytaires suivit d'une étape de polyploïdisation. L'endomitose est le processus responsable de cette polyploïdie qui consiste en la réplication nucléaire sans cytokinèse. Un mégacaryocyte peut exprimer jusqu'à 64N chromosomes. La production de plaquettes correspond à l'étape ultime de la différenciation mégacaryocytaire. Les plaquettes sont des cellules anucléées présentes dans le sang qui jouent un rôle clé dans l'hémostase et la thrombose. Elles sont formées à partir de la fragmentation d'extensions cytoplasmiques (membranes de démarcation) des mégacaryocytes et subsistent une dizaine de jours dans la circulation sanguine. Le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11, l'IL-12 et l'érythropoïétine (EPO), sont les cytokines capables de stimuler la prolifération des précurseurs mégacaryocytiques alors que l'IL-1 α et le LIF peuvent moduler la maturation et le relargage des plaquettes.

Dans ce contexte de différenciation mégacaryocytaire, une étude récente du Dr. Yan Cao en 2015 démontre que les souris déficientes pour *atg7* spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique présentent une différenciation mégacaryocytaire imparfaite. (Cao et al.) En effet, la population CD41+CD61+ représentative des mégacaryocytes est fortement diminuée dans la moelle de ces souris liée à une augmentation de la mortalité cellulaire. Par ailleurs, l'absence d'autophagie dans les progéniteurs mégacaryocytaires engendre une accumulation de mitochondries anormales qui produisent de fortes quantités de ROS. Ainsi le défaut de production de plaquettes peut être dû à la présence de ces mégacaryocytes aberrants, déficients pour l'autophagie. Ces résultats *in vivo* suggèrent donc un rôle primordial de l'autophagie au cours de la mégacaryocytopoïèse, ce qui confirme les

observations précédemment obtenues par de notre équipe en 2009. En effet, la stimulation de cellules leucémiques K562 par un ester de phorbol, le PMA, combiné avec un inhibiteur de la MAPK p38, le SB202190, conduit à la différenciation mégacaryocytaire de ces cellules qui est elle-même corrélée à une augmentation du flux autophagique. (Colosetti et al., 2009) L'utilisation de siRNA dirigés contre les gènes codant pour Beclin ou LC3 a permis d'autre part de démontrer l'importance de la mise en place de ce processus autophagique au cours de la différenciation mégacaryocytaires des cellules K562. Enfin, l'équipe du Dr. Wei Liu a récemment complétée la caractérisation des processus nécessaires à l'obtention des plaquettes issues de la maturation mégacaryocytaire. (Feng et al.) Cette étude démontre que, dans ce contexte, l'autophagie est constitutivement activée. En effet, les protéines clés de l'autophagie telles que ATG7 ou ATG5 sont clairement exprimées dans les plaquettes et cette expression est par ailleurs corrélée avec la présence de puncta de LC3 co-localisés avec LAMP1, confirmant l'induction d'un processus autophagique dans ce contexte. Il a également été démontré dans cette même étude que la formation de l'autophagosome était dépendante de la PI3KC3 puisque son inhibition par la 3MA supprime la conversion de LC3-I en LC3-II. De plus, l'autophagie mis en place est indépendante de l'activation des plaquettes puisque la stimulation par le collagène de type I, n'engendre ni la formation d'autophagosomes ni la lipidation de LC3. En revanche, cette autophagie est nécessaire à l'agrégation et l'adhésion plaquettaire puisque son inhibition bloque les principales caractéristiques fonctionnelles des plaquettes. Cette nécessité de l'autophagie dans la maturation plaquettaire a finalement été confirmée dans un modèle murin déficient pour Beclin1 (*beclin1+/-*), modèle dans lequel les souris présentent de graves défauts de coagulation.

b2.3. La Différenciation Lymphocytaire

Les lymphocytes T sont des cellules immunitaires circulantes qui sont issues de précurseurs hématopoïétiques présents dans le thymus et appelés thymocytes. Les lymphocytes T ont la capacité d'induire la réponse immunitaire grâce à leur TCR (T cell receptor) qui va reconnaître entre autre les peptides bactériens exposés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) via leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Afin de disposer d'une large bibliothèque de TCR capables de reconnaître un vaste panel de peptides, près de 50 millions de thymocytes sont produits chaque jour dans le thymus de

souris. Leur capacité à reconnaître les peptides antigéniques et d'être tolérant aux peptides du soi est cruciale pour la génération et la sélection des cellules T non auto-réactives. Pour cela, les thymocytes vont subir une double sélection, positive et négative, avant leur export en périphérie en tant que cellule T fonctionnelles. Les thymocytes exprimant le TCR sont mis au contact avec des antigènes du soi présentés par les cellules épithéliales corticales du thymus afin d'évaluer leur fonctionnalité. S'il n'y a aucune affinité entre le CMH et leur TCR, la cellule ne reçoit aucun signal de survie et va mourir par négligence. En effet, pour promouvoir une réponse immunitaire il y a besoin d'une reconnaissance minimum entre le TCR et le CMH, sans cela le lymphocyte ne pourra être activé. A l'inverse, s'il y a une trop forte stimulation du TCR par le CMH présentant un peptide du soi, un signal d'apoptose est induit, on parle alors de sélection négative. Cette sélection permet d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs qui pourraient être responsables de maladies auto-immunes. Enfin, seuls les thymocytes ayant été modérément stimulés par le CMH survivent à la sélection positive, ils deviennent alors des lymphocytes T CD4 ou CD8 et sont exportés vers les organes lymphoïdes périphériques. (Klein et al.) Afin de déterminer l'implication de l'autophagie dans ce contexte de sélection thymique, l'équipe Dr. Ludger Klein a transféré des thymocytes de souris déficients pour *atg5* dans des souris nude athymique (Nedjic et al., 2008). Ils ont ainsi pu observer un amaigrissement rapide des souris causé par le développement d'une maladie auto-immune caractérisée par l'infiltration de lymphocyte T CD4+ dans différents organes et tissus tels que le colon, le foie, les poumons, ou encore dans l'utérus indiquant ainsi, le rôle majeur de l'autophagie dans l'élimination des lymphocytes auto-réactifs. Pour mieux comprendre le rôle de l'autophagie dans la sélection des lymphocytes, certains gènes *atg* ont été éteints de façon conditionnelle dans des souris CD4-CRE (marqueur tardif de la sélection/maturation thymique). Dans ces conditions, le nombre de thymocytes n'est pas affecté. (Parekh et al.) Cependant, lorsqu'on réalise une extinction conditionnelle de ces gènes au stade précoce de la sélection sous le promoteur LCK (LCK-CRE), le nombre total de thymocytes est fortement réduit sans altérer pour autant la répartition des sous-populations CD4 et CD8. (Arsov et al.) L'ensemble de ces études suggère donc que l'autophagie est importante pour la survie et la prolifération des thymocytes avant la sélection thymique. De manière intéressante les thymocytes ont une masse de réticulum endoplasmique et de mitochondrie très élevées comparées aux lymphocytes T matures. Lorsque l'on supprime l'autophagie dans les thymocytes, la masse du réticulum et des

mitochondries n'est pas réduite dans les lymphocytes. Le réticulum endoplasmique est alors diffus, présent dans toute la cellule plutôt que localisé à un pôle comme dans des lymphocytes normaux. De plus, dans les lymphocytes déficients pour l'autophagie, un stress du réticulum endoplasmique est induit et l'augmentation de la masse mitochondriale observée se traduit par une élévation des ROS et une accumulation de vésicules. (Jia and He; Pua et al., 2007) Toutes ces altérations induisent la mort cellulaire ce qui réduit le nombre de lymphocytes T circulants. Cette importante mortalité des cellules T déficientes pour l'autophagie est donc corrélée à une augmentation de la masse mitochondriale et du réticulum, suggérant l'implication de la mitophagie et de la réticulophagie au cours de la différenciation lymphocytaire. (Pua et al., 2009)

Enfin, lors d'une infection bactérienne, les lymphocytes circulants reconnaissent les peptides bactériens complexés aux CMHII des CPA via leur TCR ce qui va induire leur prolifération et leur différenciation en différentes sous populations de lymphocytes. Plus tardivement, les lymphocytes T activées vont mourir ou devenir des cellules T mémoires. L'activation du TCR induit un relargage rapide du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique lisse, ce qui va conduire à l'activation transitoire de la protéine AMPK. Cette activation de l'AMPK permettra la production d'une forte concentration de ROS et d'ATP via la mitochondrie produisant l'énergie nécessaire aux lymphocytes T pour s'activer, proliférer et se différencier. Il existe différentes sous catégories de lymphocytes T CD4+ fonctionnellement et métaboliquement distinctes. Les deux principaux sous types sont les lymphocytes T Régulateurs (Treg) et les lymphocytes T auxiliaires ou helper (Th1, Th2 et Th17). (Michalek et al.) Au sein de la population CD4+, si mTOR est hautement activé dans les lymphocytes T, ils se différencieront en cellules Th et, à l'inverse si l'activation est faible (activation de l'AMPK forte), les lymphocytes T s'orienteront préférentiellement vers un profil de type Treg. Bien que toutes les cellules Th dépendent de l'activation de mTOR, les Th1 et Th17 requièrent l'activation du complexe 1 de mTOR (mTORC1) alors que les Th2 nécessitent l'activation du complexe 2 de mTOR (mTORC2). (Delgoffe et al.)

6. Implication de l'autophagie dans les pathologies

L'autophagie est une voie majeure du catabolisme cellulaire qui permet de maintenir l'homéostasie. Son rôle au sein des cellules est variable puisqu'il diffère en fonction des tissus et des conditions environnementales. La déficience en autophagie est responsable de

	Pathologies	Gènes mutés	Etape de l'autophagie affectée	Caractéristiques associées
CANCERS	CANCERS DU SEIN, PROSTATE...	Beclin1	Formation de l'autophagosome	La délétion monoallélique de Beclin 1 est un facteur de risque qui est associé un mauvais pronostic dans le cancer du sein, de l'ovaire, de la prostate et dans les cancers colorectaux
	CANCER COLORECTAUX	UVRAG	Maturation de l'autophagosome	La délétion ou mutation d'UVRAG est reportée dans le cas des cancers colorectaux
MALADIES NEURO-DEGENERATRICES	MALADIE DE PARKINSON	PARKIN	Mitophagie	Leurs mutations sont associées à des maladies autosomiques récessives ou à des formes précoces de la Maladie de Parkinson
		PINK1		
		X	Défaut de l'Autophagie Médiée par les protéines Chaperonnes	
	MALADIE D'ALZHEIMER	X	Défaut de l'Autophagie Médiée par les protéines Chaperonnes	
MALADIES MYO-DEGENERATIVES	MALADIE DE DANON	LAMP-2A	Défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes	
MALADIES INFLAMMATOIRES	ASTHME	ATG5	Formation de l'autophagosome	Les polymorphismes génétiques d'Atg5 sont associés à l'asthme et augmentent le risque de développer un lupus érythémateux
	LUPUS ERYTHEMATEUX			
	MALADIE DE CROHN	ATG16L1		La mutation T300A est un facteur de risque associé à la maladie de Crohn.

Inspiré de Jiang and Mizushima, 2014

Tableau 6: Les maladies humaines associées à des défauts d'autophagie. Ces dernières années, plusieurs études ont démontré que les gènes *atg* sont mutés dans différentes pathologies telles que les cancers, les maladies neuro-dégénératives ou encore lors de maladies inflammatoires chroniques. Les gènes *atg* ou les gènes impliqués dans le processus autophagique qui ont été identifiés comme mutés dans ces pathologies sont représentés dans ce tableau.

nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies liées à l'âge et le cancer (**Tableau 6**).

a. Rôles de l'autophagie dans les Cancers

Généraliser le rôle de l'autophagie dans le cancer est très compliqué puisqu'il diffère selon la pathologie.

L'autophagie peut être un processus de survie menant à l'expansion tumorale. En effet, elle peut être mise en place par les cellules tumorales pour disposer d'une autre source d'énergie permettant leur survie et leur prolifération. A *contrario*, l'autophagie peut aussi être un mécanisme de suppression tumorale puisqu'elle peut causer la mort cellulaire programmée de type II également nommée mort autophagique. A l'inverse de l'apoptose, la mort autophagique commence par la dégradation des organelles au cours des stades précoces et le cytosquelette reste intact jusqu'à ce que le processus soit très avancé.

Plusieurs liens moléculaires émergent entre des défauts de l'autophagie et le cancer. Les voies de régulation de l'autophagie sont souvent les mêmes que celles qui régulent la tumorigénèse. En effet, plusieurs suppresseurs de tumeur tels que TSC1 et TSC2 sont impliqués dans les voies en amont de l'inhibition de mTOR, stimulant ainsi l'autophagie. Cependant, il existe aussi des mutations activant constitutivement mTOR. Ceci induit par conséquent, l'activation de voies de signalisation « oncogéniques » telles que PI3K/AKT inhibant l'autophagie. Dans ce contexte, Wang *et al.* ont établi que Beclin1 était directement phosphorylé par AKT, ce qui permet sa séquestration au niveau du cytosquelette et empêche son interaction avec PI3KC3 et par conséquent réduit l'autophagie (Wang et al.). Par ailleurs, *p53* le plus commun des gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans les cancers humain, régule positivement l'autophagie dans les cellules qui présentent des dommages à l'ADN, probablement grâce à l'activation du complexe TSC1-TSC2 et à une inhibition de mTOR ou *via* l'augmentation de DRAM, une protéine lysosomale qui peut induire l'autophagie.

Il existe donc de fortes corrélations entre l'expression des protéines impliquées dans l'activation de l'autophagie et la suppression tumorale mais également entre l'inhibition de l'autophagie et l'augmentation de la prolifération tumorale.

Par conséquent, le rôle de l'autophagie dans les cancers est contradictoire. D'un côté, elle peut être le moyen mis en place par les cellules pour maintenir les cellules cancéreuses,

comme dans le cas des cellules souches leucémiques ou agir comme un mécanisme de résistance aux drogues permettant aux cellules cancéreuses de survivre *via* « l'autodigestion ». D'un autre côté, l'autophagie peut être un mécanisme de suppression tumorale permettant une immunité anti-tumorale effective et ce, probablement en protégeant les tissus sains de la toxicité de certains traitements. Ainsi, dans certains cas, l'autophagie peut être bénéfique et dans d'autres délétère.

D'autre part, l'inhibition de l'autophagie augmente les effets des agents anticancéreux dans certaines hémopathies et en particulier dans le contexte de la leucémie myéloïde chronique. Les agents thérapeutiques utilisés en routine dans cette pathologie, sont des inhibiteurs de tyrosine kinases qui stimulent l'autophagie grâce à l'inhibition de la signalisation AKT/mTOR. Cependant, cette même autophagie va augmenter la survie et le potentiel tumoral des cellules souches leucémiques qui sont insensibles au traitement et qui vont être responsables des rechutes. La suppression de l'autophagie dans ces mêmes cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques ou siRNA, augmente la mort des cellules primaires de patients comme dans les lignées traitées par les inhibiteurs de Tyrosine Kinases (TKI). Ainsi dans ce contexte leucémique, l'inhibition de l'autophagie combinée aux TKI pourrait être une nouvelle approche thérapeutique pour améliorer les résultats cliniques mais aussi pour augmenter le taux de guérison des patients souffrants de LMC.

A l'inverse de son rôle pro-tumoral, l'autophagie peut aussi être impliquée dans les mécanismes de suppression tumorale.

Le premier lien spécifique entre l'autophagie et le cancer a été établi en 1999, grâce à l'étude de Beclin1. L'autophagie a été initialement caractérisée comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Cette conclusion a été déduite à partir d'observations qui rapportent que l'allèle de Beclin1 est perdu dans 40% à 75% des cancers de la prostate, du sein ou encore des ovaires (Aita et al., 1999). Ainsi, afin de mieux comprendre l'effet de la délétion monoallélique de Beclin1, modèle murin *beclin*^{-/+} a été généré. (Liang et al., 1999). La diminution de l'expression de Beclin1 abouti à une diminution de l'autophagie ce qui induit augmentation du développement de tumeurs spontanées comme par exemple, des lymphomes, des carcinomes pulmonaires, des carcinomes hépato-pulmonaires et des lésions mammaires pré-cancéreuses. De plus, dans certaines lignées cellulaires ou dans des cellules immortalisées provenant de souris hétérozygotes pour Beclin1 (lignée rénale ou issue

d'épithélial mammaire) la suppression de l'autophagie augmente leur croissance cellulaire et leur pouvoir tumorigénique. Ces résultats indiquent que Beclin1 a un rôle essentiel dans la suppression tumorale puisque sa mutation ou son absence peut contribuer à la tumorigenèse.

b. Autophagie et Maladies neuro-dégénératives

La principale fonction cyto-protective de l'autophagie consiste à débarrasser les cellules des agrégats protéiques toxiques qu'elles accumulent avec le temps. Plusieurs maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson se caractérisent par une accumulation de débris protéiques causée ou non, par des défauts de la maturation de l'autophagosome.

b1. La maladie d'Alzheimer

Découverte il y a près d'un siècle par Alois Alzheimer, la maladie d'Alzheimer est causée par une dégénérescence progressive du cerveau de la personne âgée. Elle est caractérisée notamment par la présence de plaques extracellulaires d'amyloïde beta ($A\beta$) et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, associée aux microtubules. En plus des mutations dans le gène précurseur de l' $A\beta$ (APP), il a été trouvé dans les formes familiales d'Alzheimer, des mutations rares dans gènes codants pour la preseniline-1 et 2 (PSEN1-PSEN2). Le clivage de APP par la sous unité catalytique de la γ -sécrétase est médiée par les PSEN1 et PSEN2 et permet la production de peptides neurotoxiques d' $A\beta$.

Une des premières observations qui a suggéré que l'autophagie pouvait être altérée dans cette maladie est l'accumulation d'autophagosomes dans certaine partie du cerveau des patients atteint d'Alzheimer. Or, il est désormais acquis que le processus autophagique devient défaillant avec le vieillissement et que ce dysfonctionnement est décrit comme responsable des augmentations de PSEN1 et de l'activité de la γ -sécrétase, responsables de l'accumulation de l' $A\beta$ (Ohta et al.). Une étude de Yu *et al.* démontre que les autophagosomes de ces patients sont des réservoirs intracellulaires d' $A\beta$ qui se forment lorsque la maturation des autophagosomes en autolysosome est altérée (Yu et al., 2005). Ces altérations de maturation sont justement causées par la protéine tau mutée exprimée chez ces patients. En effet, une fois liées à LAMP-2A pour être dégradées par la CMA, les protéines tau mutées ne sont que partiellement internalisées. Les petits fragments extra-

membranaires générés s'oligomérisent directement à la surface du lysosome engendrant une perturbation de son intégrité et bloquant les fonctions normales de la CMA.

Enfin, à l'inverse des cerveaux de sujet sains, les cerveaux de patients atteints d'Alzheimer expriment très fortement des gènes codant pour les protéines clés de l'autophagie. (Lipinski et al.). En revanche, dans les régions cérébrales touchées par la neuro-dégénérescence, le niveau d'expression protéique de Beclin1 est très réduit. Ainsi l'altération du processus autophagique et l'accumulation des autophagosomes seraient la conséquence de la diminution de l'expression de Beclin1 au niveau des zones lésées (Pickford et al., 2008).

b2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson dans son «Essai sur la paralysie agitante ». Ce n'est que 60 ans plus tard qu'elle fut nommée définitivement ainsi par le neurobiologiste français Charcot.

Cette maladie neurodégénérative progressive est incurable. Les personnes atteintes de cette maladie souffrent de troubles de la fonction motrice ainsi que de troubles dans la coordination des mouvements. Elle est caractérisée par la perte sélective des neurones dopaminergiques et la présence d'inclusion intra-neurales (agrégats protéiques) désignées sous le nom de corps de Lewy. Ces derniers contiennent majoritairement de l'alpha-synucléine (α -syn), une protéine mutée dans cette pathologie dont le rôle n'est pas encore clairement défini. En condition pathologique, la protéine subie des modifications post-traductionnelles (nitratation, oxydation et dopamination), se dimérise et devient un composant très toxique pour la cellule. C'est sous cette forme que l' α -synucléine s'accumule dans les neurones conduisant au dysfonctionnement et à la dégénérescence neuronale. (Conway et al., 2000; Tsigelny et al., 2007). Dans la maladie de Parkinson, cette accumulation d' α -synucléine est liée à des altérations de la CMA et à une déficience de la fonction lysosomale causée par cette même protéine. En effet, les α -syn mutées se lient avec une très forte affinité à LAMP-2A, ce qui entrave leur translocation vers la lumière lysosomale et saturent les LAMP-2A présents à la membrane lysosomale. Cette saturation des LAMP-2A par l' α -synucléine inhibe non seulement sa propre dégradation mais aussi celles de toutes les autres protéines normalement dégradées par la CMA, contribuant ainsi à l'accumulation d'agrégats protéiques caractéristiques de cette maladie (Cuervo et al., 2004), (Martinez-Vicente et al., 2008), (Xilouri et al., 2009; Xilouri et al., 2008), (Cuervo and Wong). De plus,

les α -synucléine oligomérisées ont la capacité de se lier aux lipides membranaires, dont ceux de la mitochondrie, ce qui altère la fonction mitochondriale. De plus, PINK1 et PARKIN, deux protéines impliquées dans la mitophagie, sont décrites comme fréquemment mutées dans la maladie de Parkinson (Geisler et al.). L'ensemble de ces éléments conduit à des dommages mitochondriaux importants ainsi qu'à une altération de la mitophagie, provoquant l'accumulation de mitochondries endommagées dans le cytoplasme.

D'autre part, des études démontrent que dans cette condition pathologique, les neurones atteints présentent par rapport aux neurones sains, une plus forte induction d'autophagie. Toutefois, l'inhibition de la voie lysosomale causée par l' α -synucléine entrave la mise en place d'une autophagie fonctionnelle, empêchant la mitophagie mais également la dégradation d' α -synucléine par cette voie alternative à la CMA.

L'induction de cette autophagie bien qu'abortive est toutefois nécessaire pour contrecarrer le défaut de CMA. En effet, dans un modèle de souris sur-exprimant l' α -synucléine, la présence de Beclin1 améliore le phénotype de neuro-dégénérescence. Beclin1 permet d'augmenter l'activation lysosomale, de réduire les anomalies de la voie autophagique ce qui conduit à une diminution d' α -synucléine (Spencer et al., 2009).

c. Autophagie et Maladie Myodégénérative : Maladie de Danon

De la même manière que les maladies neuro-dégénératives, les maladies myo-dégénératives peuvent être dues à un défaut de fusion entre le lysosome et l'autophagosome (Terman and Brunk, 2005). Elles peuvent aussi résulter d'un excès d'agrégats protéiques résultant de l'incapacité des myocytes à les éliminer. La maladie de Danon est une maladie génétique caractérisée par une cardiomyopathie, une myopathie et un retard mental. Elle résulte de la mutation de la protéine lysosomale LAMP-2 et est associée à une accumulation excessive d'autophagosomes dans les muscles des patients. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques tel que de la chloroquine, la cause de la myopathie a été caractérisée comme étant la conséquence de l'altération de la fusion entre le lysosome et l'autophagosome (Bolanos-Meade et al., 2005). En plus d'affecter les muscles squelettiques, l'accumulation d'autophagosomes se produit aussi au niveau du muscle cardiaque induisant une cardiomyopathie sévère. Les souris invalidées pour *atg5* spécifiquement dans le cœur développent avec l'âge des hypertrophies cardiaques et des dysfonctionnements contractiles, lesquels s'accompagnent d'une augmentation du niveau de protéines

PROTEINES	ROLE DANS L'AUTOPHAGIE	ROLE DANS L'APOPTOSE
PROTÉINES AUTOPHAGIQUES		
Beclin1	Nucléation de l'autophagosome	Le fragment C terminal clivé induit l'apoptose mitochondrial
UVRAG	Augmente et stabilise l'interaction PI3KC3-Beclin1 Favorise la maturation de l'autophagosome	Anti-apoptotique, il inhibe la translocation de Bax du cytosol à la mitochondrie
AMBRA1	Augmente l'interaction PI3KC3-Beclin1	Régule l'apoptose mitochondriale et est clivé par les caspases
Atg3	Se conjugue avec Atg12	Régule la mort cellulaire mitochondriale
Atg5	Se conjugue avec Atg12, permet l'élongation de l'autophagosome	Interagit avec FADD pour inhiber l'apoptose, Le fragment N-terminal clivé induit l'apoptose mitochondriale
Atg12	Elongation de l'autophagosome	Stimule l'apoptose mitochondriale en inactivant Bcl-2 et Mcl-1
Atg4D	Intervient dans la lipidation de LC3	Atg4D clivé se localise à la mitochondrie et induit l'apoptose
p62	Se fixe à LC3, permet la dégradation des agrégats poly-ubiquitinés	Permet l'activation de la Caspase 8
PROTÉINES APOPTOTIQUES		
Bcl-2, Bcl-xL	Interagit avec Beclin1 et inhibe l'autophagie	Anti-apoptotique
Bad, Bak, BNIP3, Nix	Pro-autophagique, perturbe l'interaction Beclin-1-Bcl-2	Pro-apoptotique
Bax, PUMA	Pro-autophagique, induction de type non canonique régulée directement par Atg5, Atg10 et Atg7	Pro-apoptotique
Noxa	Induit l'autophagie en perturbant l'interaction Mcl-1-Beclin-1	Pro-apoptotique
Bim	Séquestre Beclin-1, inhibe l'autophagie	Pro-apoptotique
cFLIP	Prévient l'interaction entre Atg3 et LC3, inhibe l'autophagie	Inhibe la caspase 8

Adapté de Mukhopadhyay et al.,2014

Tableau 7: Les doubles rôles des protéines autophagiques et apoptotiques. Ces dernières années plusieurs protéines apoptotiques ont été identifiées comme régulateurs de l'autophagie. Généralement la régulation de l'autophagie par ces protéines apoptotiques est permise grâce à la modulation des interactions entre Beclin1 et les membres de la famille Bcl-2. Réciproquement les protéines autophagiques peuvent également réguler l'apoptose. Ainsi après leur clivage par les caspases ou les calpaïnes, les protéines pro-autophagies se relocalisent notamment au niveau de la mitochondriale où elles induisent la mort cellulaire par la voie intrinsèque de l'apoptose.

ubiquitinyllées et d'anomalies structurales des mitochondries et des sarcomères (Nakai et al., 2007).

III - Dialogue entre les caspases et l'autophagie

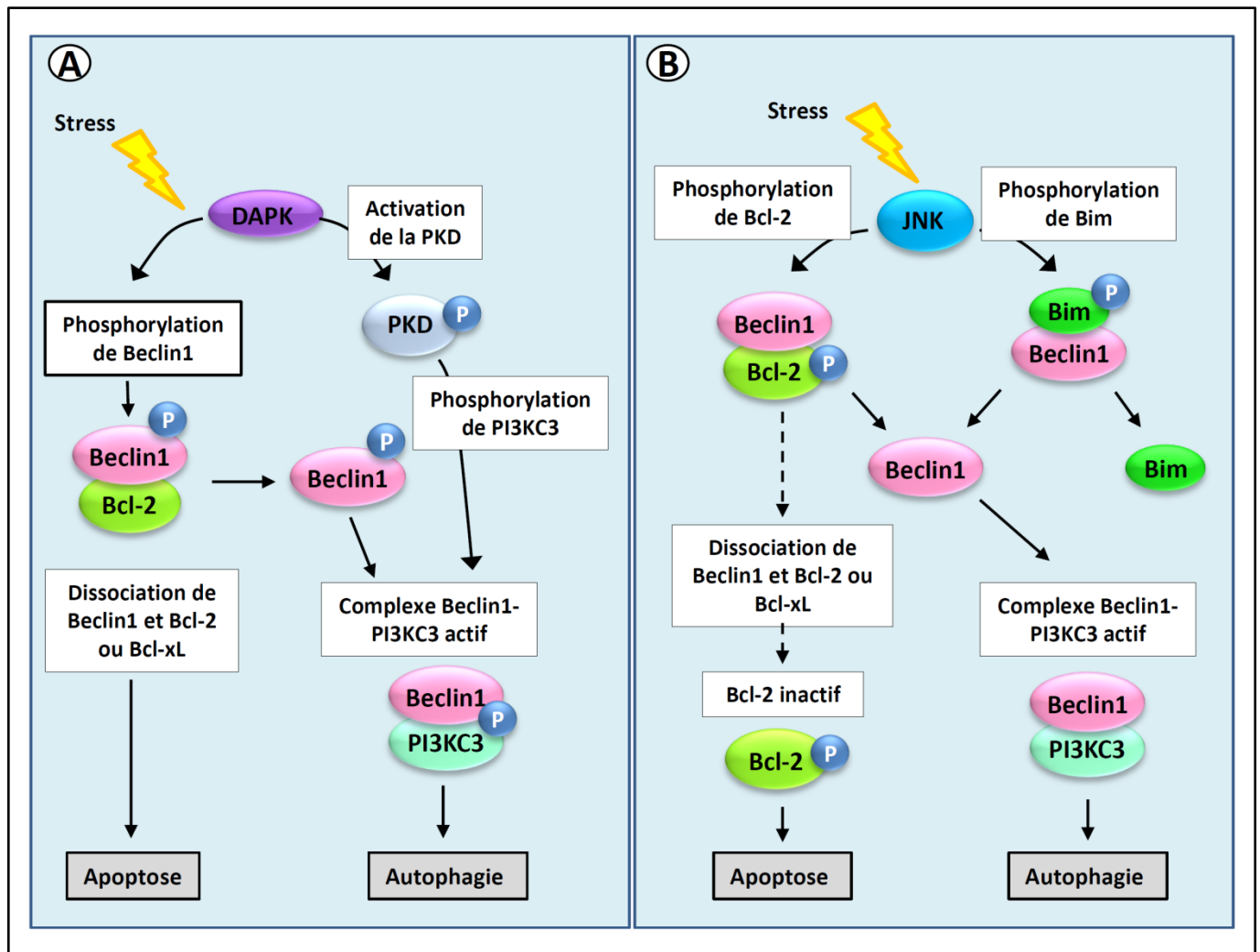
Bien que les mécanismes liant l'autophagie et l'apoptose ne soient pas encore totalement définis, des études récentes ont mis en évidence que plusieurs protéines pro et anti-apoptotiques telles que Bim et Bax ou Bcl-2 et Bcl-xL pouvaient moduler l'autophagie. Réciproquement, il a aussi été démontré que certaines protéines autophagiques contrôlant la nucléation et l'élongation sont impliquées dans la régulation de l'apoptose lorsqu'elles sont clivées par les caspases ou les calpaïnes.

Ces deux processus s'autorégulent également, influençant la localisation cellulaire des protéines pro-autophagiques afin de gérer leur activité et de promouvoir l'induction d'un processus autophagique ou apoptotique (**Tableau 7**).

A. La régulation de l'autophagie par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

La première connexion entre ces deux processus a été l'identification du complexe Beclin1-Bcl-2. Beclin1 régule le dialogue entre la voie apoptotique et la voie autophagique. En effet, grâce à son domaine BH3, elle peut interagir avec les membres de la famille Bcl-2.

L'interaction entre Beclin1 et les membres anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-xL représente le principal mécanisme de régulation de l'autophagie en réponse à divers stimuli. La liaison entre Bcl-2 et Beclin empêche son interaction avec la PI3KC3 et la formation du complexe Beclin1-PI3KC3 responsable de l'induction de l'autophagie. De plus, même si le complexe formé par Beclin1 et Bcl-2 est localisé au niveau du réticulum endoplasmique, lieu d'initiation de la nucléation, Beclin est incapable d'induire l'autophagie, confirmant que son association avec la PI3KC3 est nécessaire à la formation et à l'élongation de la membrane de l'autophagosome (Pattingre et al., 2005). A l'inverse du complexe formé avec Bcl-2, localisé au niveau du réticulum endoplasmique, le complexe Beclin1-Bcl-xL est localisé au niveau de la mitochondrie. Ainsi, bien qu'ils soient tous deux composés de Beclin1 et d'un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, la différence de localisation subcellulaire suggère que ces deux complexes ont des fonctions différentes.



Mariño *et al.*, 2014

Figure 23: Les kinases DAPK et JNK régulent de l'autophagie. (A) DAPK (Death associated protein kinase) peut stimuler l'autophagie par la phosphorylation de Beclin1 qui induit sa dissociation de Bcl-2 et favorise son association avec PI3KC3. DAPK peut aussi activer la protéine kinase D (PKD) qui phosphoryle et active alors la PI3KC3. La libération de Beclin1 et la phosphorylation de PI3KC3 induisent le processus autophagique. (B) JNK (JUN N-terminal kinase) induit l'autophagie en phosphorylant Bcl-2 et Bim perturbant ainsi leur interaction inhibitrice avec Beclin1. Ceci mène à l'activation du complexe de Beclin1-PI3KC3 et par conséquent à l'autophagie.

Enfin, lorsque les conditions sont favorables, la liaison entre Beclin1 et Bcl-2 ou Bcl-xL est forte. A l'inverse, lorsque l'autophagie est stimulée, l'affinité entre Beclin1 et ces deux partenaires est faible. Ceci résulte d'une part de la phosphorylation par JNK, sur de multiples sites de phosphorylation de Bcl-2 (thr69 ser70 et ser97) et/ou de la phosphorylation de la threonine T119 de Beclin1 par DAPK1. L'ensemble de ces phosphorylations déstabilise le complexe et favorise la dissociation de Beclin1 avec ses deux partenaires anti-apoptotiques (Wei et al., 2008), (Zalckvar et al., 2009) (**Figure 23, A**).

D'autre part, la dissociation du complexe Beclin1-Bcl-2/Bcl-xL est augmentée par la présence des membres pro-apoptotiques (BH3 only) qui vont entrer en compétition avec Beclin et se fixer avec plus d'affinité dans la poche BH3 de Bcl-2 ou Bcl-xL. Ceci va perturber leur interaction avec Beclin1 et par conséquent, permettre la liaison de Beclin1 avec la PI3KC3 et promouvoir l'autophagie. Il est à noter, qu'à l'inverse des protéines BH3 only de la famille des Bcl-2, la surexpression de Beclin1 n'est pas suffisante pour induire l'autophagie ou l'apoptose. Ceci est probablement la conséquence de la forte inhibition par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Toutefois, cette surexpression confère une cytoprotection aux inductions de stress pro-apoptotiques comme la déprivation en acides aminés, indiquant une nouvelle fonction anti-apoptotique de Beclin.

En plus de se lier à Beclin1, Bcl-2 peut contrôler l'autophagie en interagissant avec Ambra1, ce qui va perturber sa localisation cellulaire et par conséquent inhiber l'autophagie. L'expression de Bcl-2 à la mitochondrie a été démontrée comme pouvant inhiber l'autophagie en séquestrant Ambra1. En effet, Ambra1 se lie préférentiellement au pool de Bcl-2 présent à la membrane mitochondriale plutôt qu'à celui exprimé au niveau du réticulum endoplasmique et cette interaction perturbe l'induction du processus autophagique. Toutefois, si l'induction de l'autophagie se produit, Ambra1 se sépare de Bcl-2, permettant ainsi d'augmenter l'activité de Beclin1. Ainsi, l'interaction entre Ambra1 et Bcl-2 au niveau de la mitochondrie peut réguler l'autophagie dépendante de Beclin1 et l'apoptose (Strappazzon et al.).

A l'inverse des autres membres de la famille Bcl-2 possédant un domaine BH3-only, la protéine pro-apoptotique Bim, est capable d'inhiber l'autophagie. Bim liée à Beclin1, s'associe à la Dynéine (LC8) et inhibe la formation de l'autophagosome grâce à la séquestration aux microtubules de son partenaire pro-autophagique empêchant ainsi son

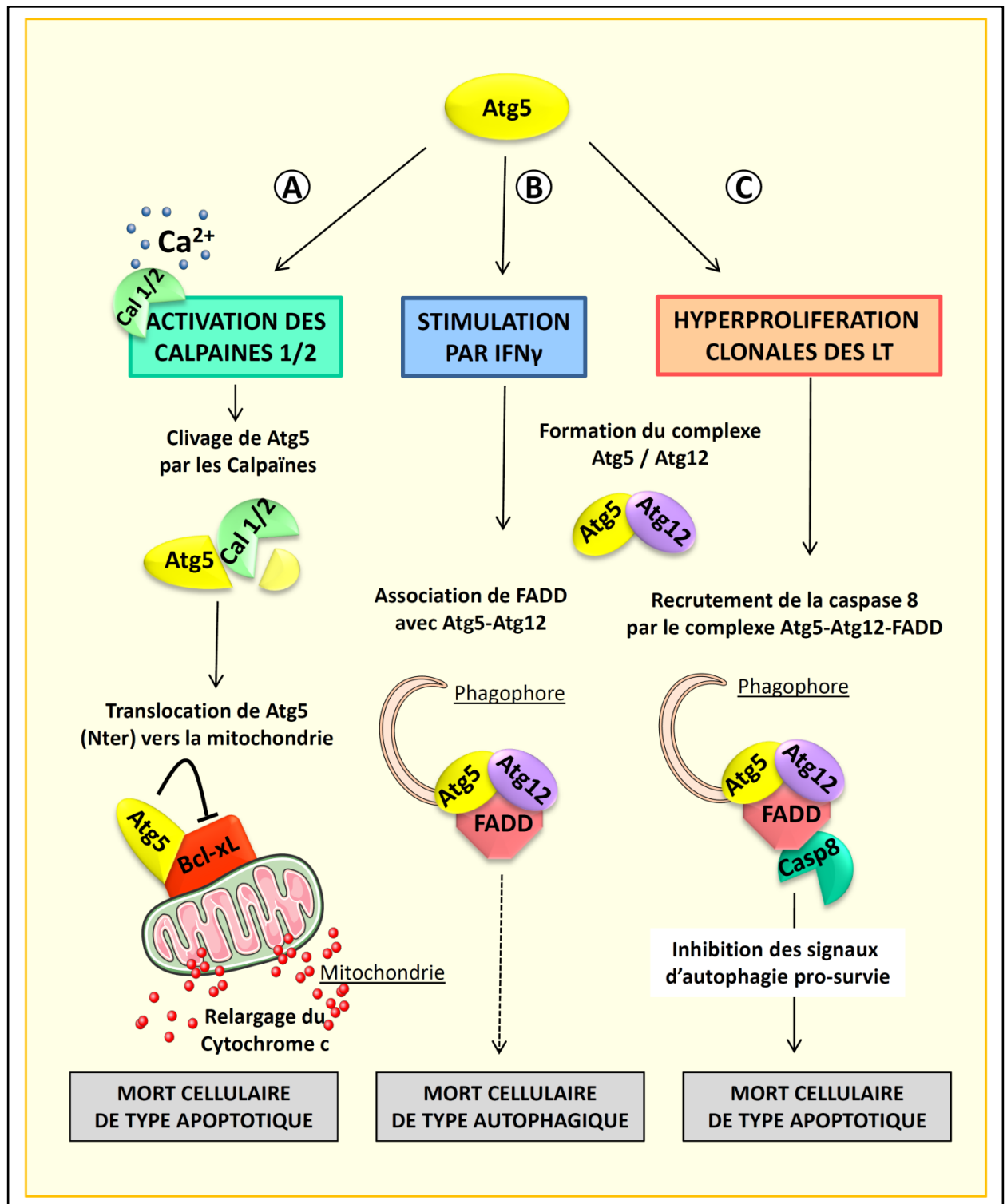


Figure 24: La protéine Atg5 au carrefour entre apoptose et autophagie. Trois principales études rendent compte des fonctions biologiques variées de la protéine Atg5. **(A)** Lors de l'activation des calpaïnes 1 et/ou 2, Atg5 est clivé et la forme tronquée résultant de ce clivage (tAtg5) peut transloquer vers la mitochondrie pour inhiber les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-xL et ainsi promouvoir l'apoptose. **(B)** En réponse à une stimulation par l'IFN γ , la protéine adaptatrice FADD, impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose, peut s'associer avec le complexe Atg5-Atg12 pour favoriser la mort cellulaire de type autophagique (ou de type II). **(C)** Pour contrôler l'hyperprolifération des lymphocytes T (LT), l'interaction de FADD avec Atg5-Atg12 permet de bloquer l'autophagie protectrice pour orienter le lymphocyte vers une mort de type apoptotique suite à une activation de la caspase 8.

acheminement vers l'omégasome (Luo et al.). Lorsque Bim est phosphorylé par MAPK8/JNK, il se dissocie des microtubules et de Beclin1, ce qui permet la translocation de ce dernier au niveau du réticulum endoplasmique vers l'omégasome. Une fois Bim dissocié de LC8, il peut se lier aux protéines de la famille Bcl-2 pour activer Bak-Bax et induire l'apoptose par la voie mitochondriale (Lei and Davis, 2003) (**Figure 23B**).

B. L'inhibition de l'autophagie par les acteurs de la voie extrinsèque de l'Apoptose

Les protéines autophagiques sont aussi impliquées dans la régulation de la voie extrinsèque de l'apoptose. Généralement, le clivage des ATG va inhiber l'induction de l'autophagie et donc accroître l'apoptose induite par la stimulation des récepteurs de mort.

Cette interrelation entre la voie extrinsèque et l'autophagie est renforcée par l'interaction entre FLIP (Flice inhibitory protein), et ATG3. En effet, de récentes études démontrent que la protéine anti-apoptotique FLIP est capable d'inhiber l'autophagie.

En effet, la protéine FLIP interagit avec ATG3 empêchant la lipidation de LC3, l'élongation du phagophore et par conséquent l'induction de l'autophagie (Lee et al., 2009).

En plus d'être inhibé par sa liaison avec la protéine FLIP, ATG3 peut être clivé par la caspase-8. En effet, après une stimulation par le TNF α ou le TRAIL, la caspase 8 entraîne le clivage d'ATG3. Par ailleurs, la simple surexpression de la caspase 8 est suffisante pour dégrader ATG3. Le clivage d'ATG3 par la Caspase 8 est le mécanisme majeur permettant d'inhiber l'autophagie suite à l'activation d'un récepteur de mort (Oral et al.).

Ces études ne sont pas les seules à démontrer l'existence d'un lien entre l'autophagie et les acteurs de la voie extrinsèque. En effet, Pyo *et al.* démontrent qu'en réponse à l'IFN γ , la protéine ATG5 contribue à la mort cellulaire grâce à son interaction avec le Death Domain de FADD. Cette interaction empêche l'apoptose mais promeut la formation d'autophagosomes et l'orientation vers une mort dite autophagique (Pyo et al., 2005) (**Figure 24**).

D'autres travaux démontrent que cette connexion entre la caspase 8, FADD et l'autophagie existe dans les lymphocytes. Elle a été observée grâce à l'étude des lymphocytes T déficients pour la Caspase-8 ou pour FADD qui présentent une augmentation de l'autophagie. Dans ce contexte, l'autophagie induite permet le recrutement de la caspase-8 grâce à l'interaction entre le complexe ATG12-ATG5 et FADD (Bell et al., 2008). La formation de ce

macrocomplexe va, non seulement, permettre de bloquer l'autophagie induite mais également permettre l'activation de la caspase-8 ce qui va conduire à la mort des cellules et l'arrêt de l'expansion clonale des Lymphocytes T.

C. La régulation de l'Apoptose par le clivage des protéines autophagiques

En conditions apoptotiques, un grand nombre de protéines autophagiques ont été identifiées comme substrats des caspases. Leur clivage mène à l'inhibition de l'autophagie et dans la majorité des cas à une augmentation de l'apoptose.

1. Le Clivage de Beclin et de ses partenaires pro-autophagiques

Wirawan a démontré l'existence d'un clivage de Beclin1 dépendant des caspases lors de la déprivation en IL-3 dans la lignée hématopoïétique murine BaF3. En effet, la déprivation en IL-3 induit de l'autophagie qui est très rapidement suivie de l'induction de l'apoptose (dès 16h). En parallèle de l'activation de la caspase 3 et du clivage de PARP, ils observent le clivage de Beclin1 en trois fragments, un de 50 kDa et deux de 37 kDa et un clivage de la PI3KC3 en deux fragments de 50 kDa. L'ajout d'inhibiteur de caspases (zVAD-fmk) inhibe le clivage de la PI3KC3 mais également celui de Beclin1. Par contre, le fragment de 50 kDa est maintenu malgré l'inhibition des caspases suggérant une protéolyse générée par d'autres protéases. Par la suite, grâce à l'ajout de protéines recombinantes, les auteurs ont démontré que les clivages observés pour Beclin1 et PI3KC3 sont dépendants des caspases 3, 7 et 8. Ces résultats ont été confirmés par des études qui ont mis en évidence l'existence de sites consensus TDVD¹³³ et DQLD¹⁴⁹ dans la séquence de Beclin1 qui correspondent bien aux sites de clivage des caspases puisque la mutation de leur aspartate en une glutamine abolit le clivage de Beclin1. (Wirawan et al.)

Afin de déterminer le rôle de ces fragments de clivage, Wirman a généré les fragments clivés de Beclin1 (N-terminal-aa1-133 et C-terminal-aa 150-450) et les a transfecté dans des cellules HeLa. Leur simple surexpression n'est ni capable d'induire de l'apoptose, ni de l'autophagie dans des conditions où la forme totale de Beclin1 est en mesure d'induire de l'autophagie.

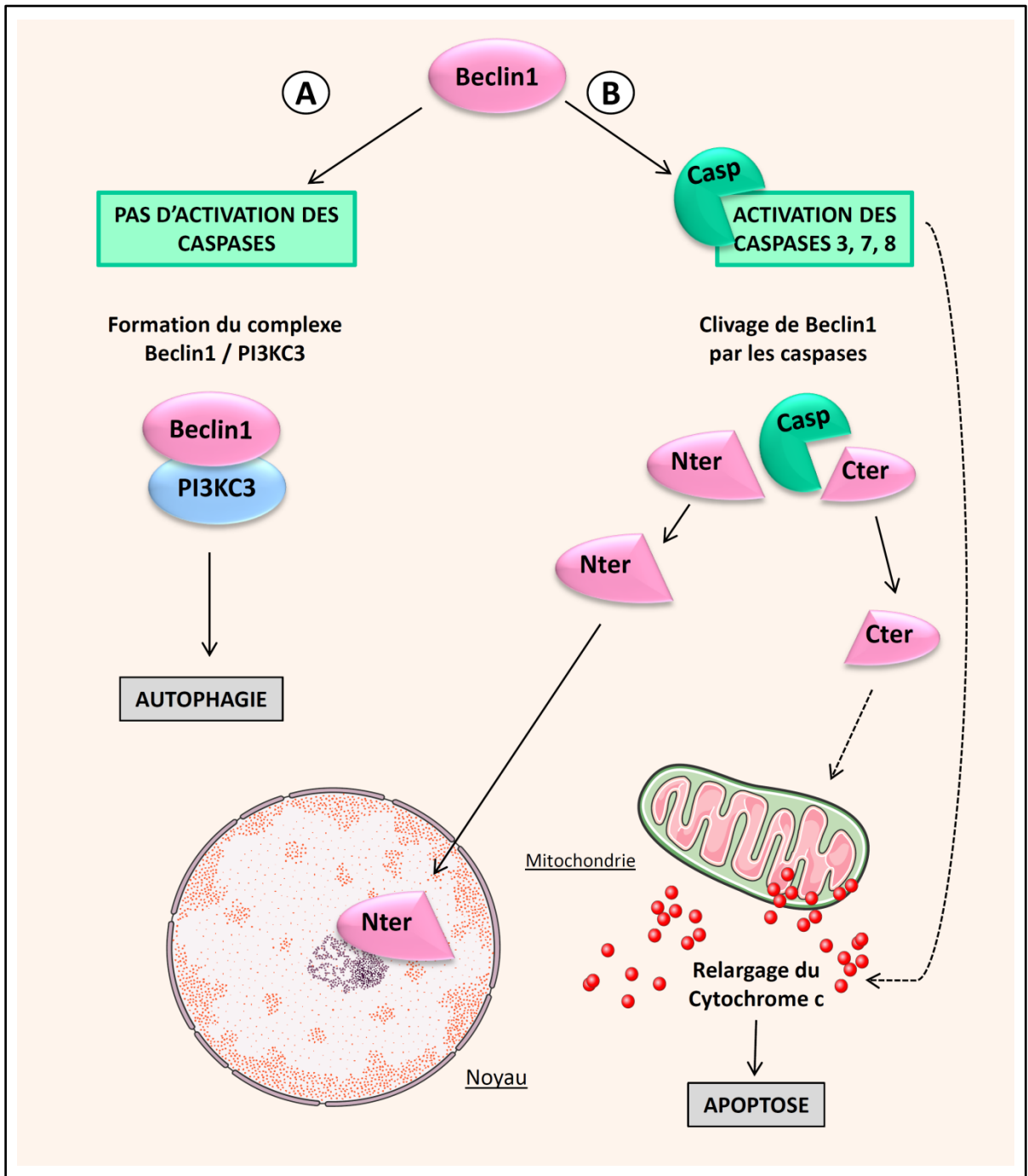


Figure 25: Le rôle du clivage par les caspases de la protéine Beclin1. (A) Lorsque les caspases ne sont pas activées, Beclin1 s'associe avec la PI3KC3 pour promouvoir la nucléation du phagophore. (B) Suite à l'activation des caspases 3, 7 ou 8, Beclin1 est clivé en deux fragments (N-terminal, Nter ou C-terminal, Cter) et perd sa fonction pro-autophagique. Cependant, le fragment Cter peut transloquer à la mitochondrie pour amplifier le signal pro-apoptotique lié à l'activation des caspases 3, 7 ou 8 et le fragment Nter peut être relocalisé dans le noyau où il exerce des fonctions potentielles encore inconnues.

En revanche, l'apoptose induite lors de la déprivation en IL-3 est augmentée de 45% lorsque la forme C-terminale de Beclin1 est surexprimée. Cette augmentation de la mort cellulaire est la conséquence de la relocalisation des fragments de Beclin1. En effet, alors que le fragment Nt est nucléaire, le fragment C-terminal se localise au niveau de la mitochondrie, ces deux localisations contrastent avec l'expression cytoplasmique de la forme non clivée de Beclin1. L'expression du C-terminal de Beclin1 à la mitochondrie a pour conséquence d'induire le relargage du cytochrome C et de Omi.

Une fois, le fragment C-terminal de Beclin1, relocalisé à la mitochondrie, il amplifie le processus apoptotique et acquiert par conséquent une activité pro-apoptotique (**Figure 25**).

Beclin1 et ses partenaires incluant Ambra1 et UVRAG, qui permettent l'étape d'initiation de l'autophagosome, peuvent aussi réguler l'apoptose mitochondriale. En effet, Ambra1 peut être clivé à la fois par les caspases et les calpaïnes à la suite de stimuli pro-apoptotiques inhibant l'autophagie et favorisant la mort par apoptose (Pagliarini et al.). Par ailleurs, durant les traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques, UVRAG a été démontrée comme possédant également une activité anti-apoptotique. En effet, UVRAG, grâce à son interaction avec Bax, empêche la translocation de Bax du cytoplasme vers la mitochondrie, ce qui empêche l'induction d'apoptose des cellules cancéreuses.

2. Les fonctions ambivalentes d'Atg5 et Atg4D

Les protéines responsables du processus d'élongation du phagophore participent aussi à la mort mitochondriale. En effet, ATG5 peut être clivée par les calpaïnes ce qui va induire spontanément l'apoptose dans les neutrophiles humains. Ainsi, le fragment N-terminal généré lors de cette protéolyse va être capable de se transloquer à la mitochondrie où il s'associe avec Bcl-xL pour favoriser le relargage du cytochrome C (Yousefi et al., 2006). La simple surexpression de ce fragment augmente la fragmentation nucléaire et empêche l'accumulation de LC3-II. De ce fait, ATG5 clivée induit directement l'apoptose mais est incapable d'induire l'autophagie (**Figure 23 A**).

D'autre part, dans les conditions où les caspases sont activées, la caspase 3 clive l'endopeptidase ATG4D (DEVD⁶³K) intervenant dans la lipidation de LC3 (ATG8). De manière très intéressante, ATG4D clivée présente une activité peptidase plus importante, ce qui augmente sa capacité à cliver et à délipider GABARAPL1 (Atg8 paralogue) induisant une

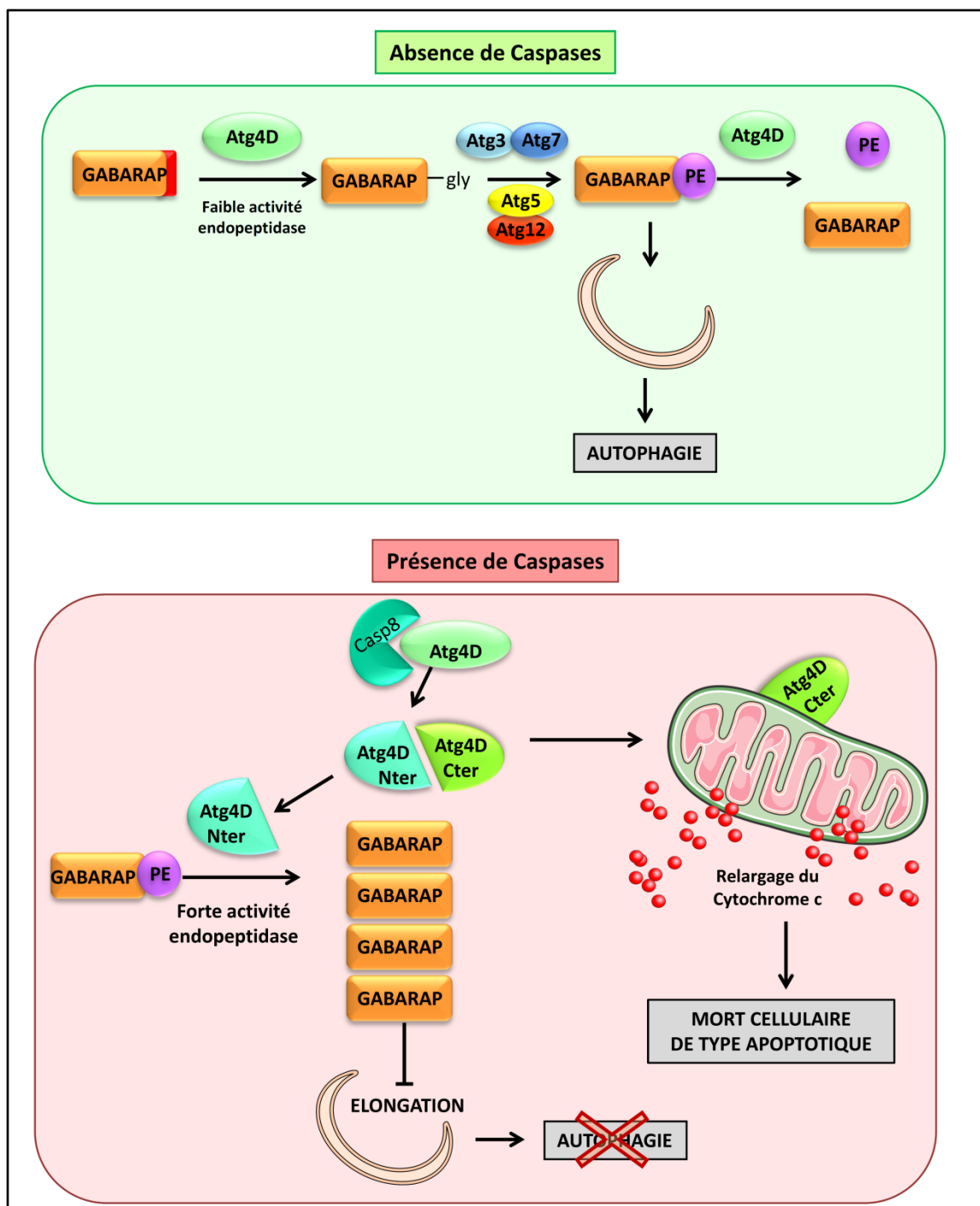


Figure 26: Le rôle du clivage d'Atg4 par les caspases. (A) En absence de l'activation des caspases, la protéase Atg4 possède une faible activité endopeptidase, néanmoins cette activité est suffisante pour initier la lipidation de GABARAP (paralogue de LC3). **(B)** Lorsque les caspases sont activées, elles clivent Atg4D en deux fragments. Le fragment N-terminal (Atg4D Nter) voit son activité endopeptidase fortement augmentée ce qui augmente la délipidation de GABARAP. La délipidation de GABARAP étant plus rapide que sa lipidation par les protéines Atg3, Atg7, Atg5 et Atg12, on observe une inhibition de l'autophagie. Le fragment C-terminal d'Atg4D (Atg4D Cter) est lui, relocalisé à la mitochondrie où il induit la perméabilisation membranaire et à la mort par apoptose.

diminution de la formation des autophagosomes (Betin and Lane, 2009). Le fragment C-terminal se relocalise à la mitochondrie et qui accroît l'apoptose mitochondriale. D'ailleurs, la seule surexpression du fragment C-terminal est capable d'induire l'apoptose mitochondriale. Cette propriété pro-apoptotique du fragment C-terminal est probablement due à la présence d'un domaine BH3 qui lui permet d'interagir avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Betin et al.) (**Figure 26**).

D. L'activation des caspases par l'autophagosome

Les caspases peuvent être activées par leur recrutement à l'autophagosome. A ce jour, ce mécanisme d'activation n'a été décrit que pour la caspase 8. La caspase 8 peut être activée dans un complexe semblable au DISC et assemblé au niveau de la membrane des autophagosomes (Young et al.).

L'activation de la caspase 8 par l'autophagie a été observée à la suite d'un traitement par des inhibiteurs du protéasome qui ne requiert donc pas l'activation des récepteurs de mort, suggérant que cette autophagie active la caspase 8 par la voie intrinsèque (Laussmann et al.). Il est décrit deux voies de recrutement de la caspase 8 à l'autophagosome. La première montre que la forme ubiquitinylée de la caspase 8 se lie à p62/SQSTM1 (une protéine cargo impliquée dans l'acheminement des protéines à dégrader vers l'autophagosome) ce qui lui permet d'être recruté à l'autophagosome *via* une interaction directe entre p62 et LC3 (Hou et al.). La deuxième voie décrite pour le recrutement de la caspase 8 à l'autophagosome nécessite l'interaction entre FADD et Atg5 (Pyo et al., 2005).

IV - Les récepteurs Purinergiques

A. Généralités

Les récepteurs purinergiques sont des récepteurs transmembranaires activés par des nucléotides. En 1978, Burnstock introduit une classification de ces récepteurs encore valable aujourd'hui. Leurs ligands étant des purines, telles que l'ATP ou l'ADP ils sont nommés récepteurs Purinergiques. Ceux-ci sont classés en deux grandes sous familles : les P1 récepteurs (P1-R) sensibles à l'adénosine et les P2 récepteurs dont les ligands sont l'ADP ou

	Principal substrat	Voie de signalisation
Récepteurs P1-R		
A1	Adénosine	$G_i \rightarrow \text{AMPc} \downarrow$
A2a	Adénosine	$G_s \rightarrow \text{AMPc} \uparrow$
A2b	Adénosine	$G_s \rightarrow \text{AMPc} \uparrow$
A3	Adénosine	$G_i \rightarrow \text{AMPc} \downarrow$
Récepteurs P2RX		
P2RX1-P2RX7	ATP	Canaux à ATP
Récepteurs P2RY		
P2RY1	ADP	$G_q/G_{11} \rightarrow \text{PLC}\beta; \text{IP}_3 \uparrow; \text{Ca}^{2+} \uparrow \text{ et PKC}$
P2RY2	ATP = UTP	$G_q/G_{11} \rightarrow \text{PLC}\beta; \text{IP}_3 \uparrow; \text{Ca}^{2+} \uparrow \text{ et PKC}$
P2RY4	UTP	$G_q/G_{11} \rightarrow \text{PLC}\beta; \text{IP}_3 \uparrow; \text{Ca}^{2+} \uparrow \text{ et PKC}$
P2RY6	UDP	$G_q/G_{11} \rightarrow \text{PLC}\beta; \text{IP}_3 \uparrow; \text{Ca}^{2+} \uparrow \text{ et PKC}$ $G_{12}/G_{13} \rightarrow \text{AC}, \text{AMPc} \uparrow$
P2RY11	ATP	$G_q/G_{11} \rightarrow \text{PLC}\beta; \text{IP}_3 \uparrow; \text{Ca}^{2+} \uparrow \text{ et PKC}$ $G_s \rightarrow \text{AMPc} \uparrow$
P2RY12	ADP	$G_i \rightarrow \text{AMPc} \downarrow$
P2RY13	ADP	$G_i \rightarrow \text{AMPc} \downarrow$
P2RY14	UDP-glucose	$G_q/G_{11}; G_i \rightarrow \text{AMPc} \downarrow$

Burnstock, 2007

Tableau 8 : Propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des récepteurs purinergiques. Les récepteurs purinergiques sont divisés en 3 sous-familles les récepteurs : les récepteurs P1-R, les récepteurs P2RX et les récepteurs P2RY. Chaque sous famille possède des affinités de substrats (nucléosides ou nucléotides (diphosphates ou triphosphates) et des fonctionnalités différentes. Ce tableau indique les ligands préférentiels et les voies de signalisation les récepteurs purinergiques activent.

l'ATP. En 1985, Burnstock et Kennedy suggèrent que les récepteurs P2 sensibles à l'ATP peuvent être subdivisés en deux groupes, les récepteurs P2RX et P2RY (Burnstock and Kennedy, 1985). Ces deux catégories de récepteurs présentent des affinités de substrats, des structures et des fonctionnalités différents. Ainsi en 1994, les récepteurs P2X sont identifiés et définis comme des canaux alors que les récepteurs P2Y correspondent à des récepteurs couplés aux protéines G (Abbracchio and Burnstock, 1994; Abbracchio et al., 1996).

Aujourd'hui, quatre P1-R, sept P2RX (P2RX 1 à P2RX 7) et 8 P2RY (P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6, P2RY11, P2RY12, P2RY13, P2RY14) ont été identifiés chez l'homme. Des études ont permis de démontrer que non seulement l'adénosine, ses dérivés phosphatés mais aussi l'uridine, et de manière plus singulière la guanine, la thymine et la cytosine peuvent participer à l'activation de ces récepteurs. De plus, des nucléotides autres que l'ATP peuvent agir spécifiquement dans l'activation des P2RY.

B. Les P1-R

Les quatre récepteurs de cette famille sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G (RCPG). Deux d'entre eux, les récepteurs A1 et A3 sont couplés à des protéines G inhibitrices (Gi) qui, après la stimulation du récepteur, permettent de diminuer la concentration intracellulaire en AMPc. Les deux autres récepteurs A2a et A2b, sont couplés à des protéines G stimulatrices (Gs) qui vont induire une augmentation de la concentration de l'AMPc intracellulaire (Burnstock, 2007) (**Tableau 8**).

C. Les P2RX

Les récepteurs P2RX sont des canaux ioniques qui permettent le passage de part et d'autre de la membrane de cations et sont, par conséquent, appelés récepteurs ionotropiques. Le ligand naturel de cette famille de récepteur est l'ATP. Toutefois pour certains d'entre eux et dans une moindre mesure, les P2RX peuvent être activés par de l'ADP.

Les P2RX vont s'associer entre eux pour former un trimère créant ainsi le canal ionique, ce dernier peut être homotrimérique (P2XR1 et P2XR5) ou hétérotrimérique (P2XR2-3, P2XR1-2, P2XR2-6, P2XR1-5). Les associations hétérotrimériques sont très variables, seul P2XR7 doit nécessairement être homotrimérique pour être fonctionnel, à l'inverse de P2XR6, pour lequel à ce jour, aucun homotrimère n'a été identifié. L'activation des P2RX conduit à une

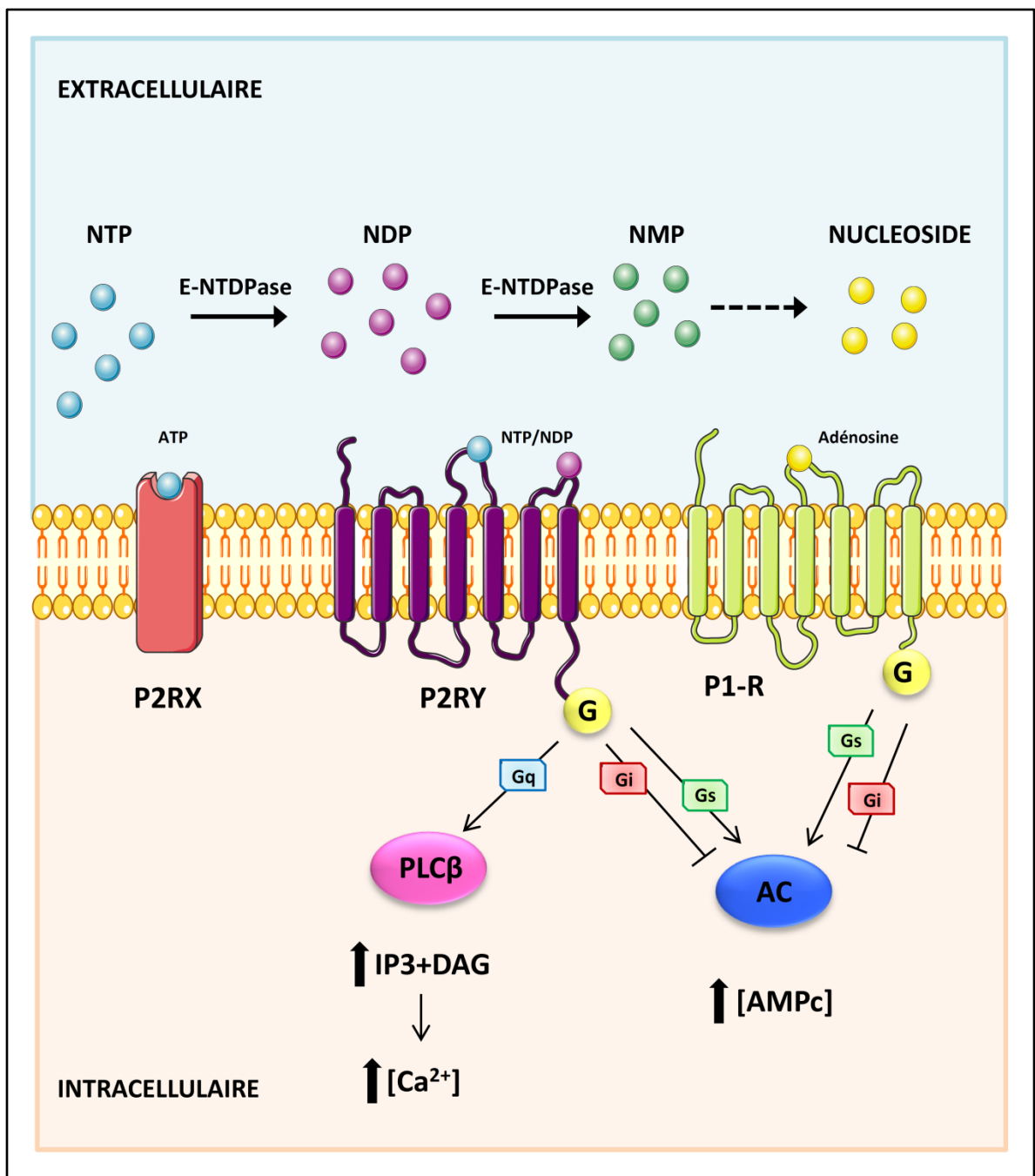


Figure 27: L'activation des récepteurs purinergiques par les nucléotides extracellulaires. Les nucléotides (ATP/ADP et UTP/UDP) ou nucléosides (adénosine) sont les ligands naturels des récepteurs purinergiques. Leurs liaisons aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires (récepteurs P2Y et P1) induisent des cascades de signalisation cellulaire spécifiques en fonction des propriétés de la protéine G à laquelle ils sont associés. Ainsi, la stimulation des récepteurs couplés aux protéines Gq (P2RY1, 2, 4, 6, 11) induiront l'activation de la phospholipase β (PLC β), alors que ceux associés aux protéines Gs ou Gi (P2RY12, 13 et les P1-R), moduleront les concentrations d'AMPc intracellulaires *via* adénylate cyclase (AC). À l'inverse des récepteurs P2Y et P1 qui sont couplés aux protéines G, les P2X sont des récepteurs ionotropiques qui une fois activés par l'ATP induisent un efflux de potassium et un influx d'ions sodiques et calciques.

dépolarisation membranaire et permet une augmentation du calcium intracellulaire grâce à un influx d'ions calciques et sodiques et à l'efflux de potassium (**Tableau 8**).

D. Les P2RY

Les P2RY sont, comme les P1-R, des RCPG à 7 domaines transmembranaires. Par contre, ils possèdent un panel plus large de ligands et ne sont pas uniquement activés par des purines comme l'adénosine mais aussi par des pyrimidines telles que l'uridine (**Tableau 8**). Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Ils conservent une très forte homologie dans leurs domaines transmembranaires mais présentent une grande diversité au niveau de leurs domaines C-terminal intracellulaires. Cette variabilité au sein des P2RY a une influence sur leur degré d'affinité avec les différents types de protéines G hétérotrimériques, les Gq/11, Gs ou encore Gi. Chaque P2RY se lie à une seule protéine G hétérotrimérique. Certains récepteurs P2RY peuvent être activés par des nucléotides diphosphates (ADP et/ou UDP) tandis que d'autres sont principalement activés par des nucléotides triphosphates (ATP et /ou UTP). Par ailleurs, certains P2RY sont activés à la fois par des purines ou des pyrimidines (P2RY2, 4, 6) alors que d'autres ne répondent qu'à la stimulation par des purines (P2RY1, 11, 12, 13).

1. Les P2RY et leurs fonctions

En réponse à leurs ligands, les P2RY vont activer, soit la phospholipase C permettant le relargage de calcium intracellulaire, soit activer l'adénylate cyclase modifiant ainsi les niveaux d'AMPC (Davis and Lazarowski, 2008), (Burnstock, 2006b) (**Figure 27**).

Ainsi chez les mammifères, la stimulation des récepteurs P2RY1, 2, 4, 6 et 11 conduit à l'activation des PLC induisant la formation d'IP3 et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire. En effet, ces RCPG sont spécifiquement couplés aux petites protéines Gq11 connues pour activer la Phospholipases C beta (PLC β). Sur les quatre isoformes de PLC identifiées, seule l'activation de la PLC β 3 et la PLC β 4 a été confirmée. Après la stimulation de ces P2RY, la PLC β hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en Diacylglycérol (Nowak et al.) et en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3). L'IP3 va agir au niveau du réticulum endoplasmique et conduire à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Ainsi, à la suite de la stimulation du P2RY6 de macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDM) par de l'UDP, la

concentration d'IP3 intracellulaire augmente très rapidement et arrive à son niveau maximum après 15 à 30 min, puis diminue très doucement pendant plusieurs heures avant de retourner à un niveau basal (Roach et al., 2008).

D'autre part, les récepteurs P2RY12, 13, et 14 qui sont couplés à des petites protéines G de type Gi vont avoir une activité différente. Ainsi, leur stimulation conduit à l'inhibition de l'accumulation intracellulaire de l'AMPc. Enfin, le P2RY11 est une exception, il est le seul récepteur purinergique qui, une fois stimulé, peut conduire à l'activation à la fois de l'Adenylate cyclase et de la PLC conduisant à l'accumulation d'AMPc et d'IP3 (Ralevic and Burnstock, 1998) , (Communi et al., 1997).

2. Les Récepteurs Purinergiques, leurs fonctions physiologiques et les pathologies associées

La spécificité fonctionnelle des P2RY dépend des protéines G qui leurs sont associés. Ainsi plusieurs études se sont concentrées sur l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes des P2RY pour l'élaboration de nouveaux traitements.

a. Leurs fonctions physiologiques

a1. Le P2RY2

Plusieurs études démontrent que les P2RY2 sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Ils sont responsables de la génération de signaux chimio-attractant ou de l'activation des cellules immunitaires. Cette activation peut ainsi conduire à l'induction de l'inflammation, de la prolifération et de la différenciation cellulaire ainsi qu'à la sécrétion de divers médiateurs inflammatoires (Di Virgilio et al., 2001; Jacob et al.).

De manière plus précise, dans les cellules hématopoïétiques, ce récepteur purinergique joue aussi un rôle important. En effet, dans la lignée leucémique monocyttaire U937, l'activation du P2RY2 par l'ATP ou l'UTP extracellulaire induit des changements morphologiques caractéristiques de la différenciation du monocyte en macrophage, à savoir, un arrêt de la prolifération, une augmentation des récepteurs du complément de types 1 et 3 ainsi qu'une augmentation de leur sensibilité au chimio-attractant tels que le MCP-1 (Cowen et al., 1991). De plus, le calcium relargué de manière PLC β dépendante permet d'induire la

phosphorylation de MAPK1/2 et ERK1/2 via l'activation commune de PI3K et de c-src. Ces deux voies contribuent aux changements morphologiques observés au cours de la différenciation macrophagique (Santiago-Perez et al., 2001).

a2. P2RY1 - P2RY12 et agrégation plaquettaire

Le P2RY1 est présent dans de nombreux tissus incluant le cœur, les vaisseaux sanguins et les cellules sanguines. Ce récepteur est absolument requis pour l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Pour renforcer l'effet du P2RY1, le P2RY12 permet la stabilisation des agrégats plaquettaires induit par la thrombine qui est un agent coagulant (Daniel et al., 1998), (Cattaneo). La nécessité de ce récepteur pour l'obtention d'une agrégation complète a été confirmée grâce à l'utilisation de souris P2RY12 déficientes. En effet, après blessure, le temps de saignement de ces souris est prolongé, une observation retrouvée chez les patients déficients pour P2RY12. Ainsi, la co-activation de P2RY1 et P2RY12 est nécessaire à la formation du thrombus induit par l'ADP car leur inhibition par des antagonistes spécifiques est capable de diminuer l'agrégation plaquettaire. Toutefois, dans ce processus P2RY1 et P2RY12 jouent des rôles distincts. En effet, alors que l'inhibition de P2RY1 n'a que peu de conséquences sur l'agrégation, P2RY12 demeure indispensable. Celui-ci est directement impliqué dans la présentation des phosphatidylsérines exprimées à la surface des plaquettes ce qui est responsable de leur coagulation (Leon et al., 2003).

Grâce à son rôle pro-coagulant, P2RY12 est le récepteur ciblé dans la régulation de la coagulation. La drogue la plus connue pour agir sur P2RY12 est un antagoniste du récepteur : le Clopidogrel (Plavix) utilisé comme anticoagulant dans le traitement de la thrombose et des AVC.

a3. Le P2RY6

Tout comme le P2RY2, le P2RY6 joue un rôle important dans l'inflammation et dans la réponse immunitaire innée contre les infections bactériennes grâce au recrutement des monocytes et des macrophages après son activation par de l'UDP (Zhang et al.). Plusieurs études montrent que l'activation du P2RY6 est impliquée dans la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires telles que MCP-1 (CCL2), le TNF α , ou IL-8 (Cox et al., 2005; Garcia et al., 2014; Warny et al., 2001; Zhang et al., 2011). Or, MCP-1 est une des cytokines clés permettant le recrutement des monocytes et des lymphocytes T sur les sites d'infection ou

inflammatoires. De plus, lorsque l'on mime une infection bactérienne par l'ajout de LPS, la stimulation du P2RY6 par de l'UDP permet d'augmenter la sécrétion de ces mêmes cytokines. L'ensemble de ces observations confirme le rôle majeur de P2RY6 d'une part dans le recrutement des cellules immunitaires et d'autre part dans l'amplification de la réponse immunitaire innée. P2RY6 est fortement exprimé à la surface des cellules de la microglie et ainsi l'activation du P2RY6 par l'UDP permet l'augmentation du potentiel phagocytaire des cellules de la microglie. Par ailleurs, l'activation du P2RY6 par l'UDP a également été démontrée comme permettant l'augmentation du potentiel phagocytaire des cellules microgliales. En effet, P2RY6 est fortement exprimé à la surface des cellules de la microglie. Ainsi, lorsque l'UDP est relargué dans les zones lésionnelles, il facilite la phagocytose des débris cellulaires et ceci de manière P2Y6 dépendante.

L'expression de P2RY6 permet non seulement aux cellules de la microglie d'accroître leur sensibilité aux « eat-me signals » (nucléotides) et d'augmenter leur capacité phagocytaire mais également d'initier l'élimination des débris cellulaires au niveau du système nerveux central (Inoue et al., 2009; Koizumi et al., 2007).

b. Leur implication dans les pathologies

b1. P2RY12 et P2RY2, impliqués dans le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses

Depuis une décennie, les plaquettes ont été démontré comme jouant un rôle dans la progression tumorale et le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses (Camerer et al., 2004) (Rickles and Falanga, 2001). Ainsi, dans les modèles murins de métastases pulmonaires, la suppression des plaquettes circulantes ou l'inhibition pharmacologique de l'activation plaquettaire diminue le potentiel métastatique des cellules tumorales circulantes (Kato et al., 1997) (Erpenbeck and Schon). Ces observations ont été confirmées par un essai clinique publié en 2012, lequel confirme que les risques de développer des métastases cancéreuses sont moindres lorsque les patients sont traités par de l'aspirine à une dose permettant d'agir comme anti-coagulant (Rothwell et al.).

En plus de leur sécrétion de TGF β qui agit comme un facteur pro-tumoral, les plaquettes expriment le P2RY12 qui joue un rôle prédominant dans leur activation, leur agrégation et la formation de thrombus. Plusieurs études démontrent que le P2RY12 est également impliqué

dans le pouvoir métastatique des cellules tumorales. En effet, l'absence de P2RY12 diminue significativement le nombre de métastases pulmonaires chez la souris. Des analyses plus poussées ont démontré que l'absence de P2RY12 dans les plaquettes inhibe leur sécrétion de cytokines conduisant ainsi à une diminution de l'extravasation tumorale mais également à une réduction de la formation d'un microenvironnement pro-métastatique (Wang et al.). Par ailleurs, le P2RY12 n'est pas le seul récepteur purinergique impliqué dans le pouvoir pro-tumoral des plaquettes. En effet, Schumacher démontre que l'adénosine sécrétée par les plaquettes activées induit l'ouverture de la barrière endothéliale permettant la migration des cellules tumorales (Schumacher et al.). Cette étude identifie le récepteur P2RY2, exprimé à la surface des cellules endothéliales, comme principal médiateur de cet effet. En effet, le P2RY2, une fois activé par l'ATP, va induire l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et l'activation de la PKC. Ces deux événements sont responsables de l'ouverture de la barrière endothéliale (Knezevic et al., 2009) (Gavard and Gutkind, 2008).

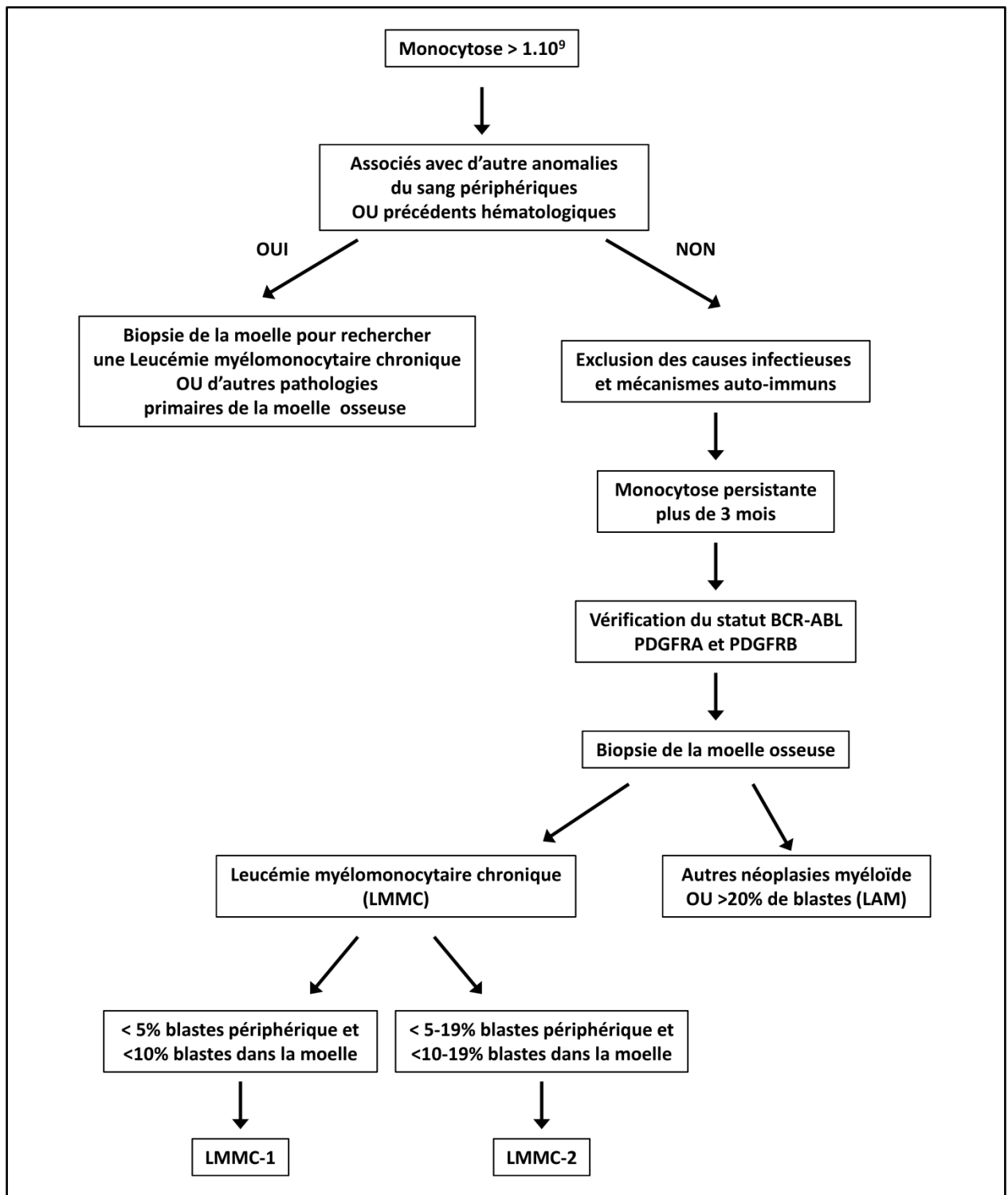
b2. P2RY et Cancers

Enfin, la sur-expression de nombreux récepteurs purinergiques ont été observés dans plusieurs types de cancers.

C'est le cas du mélanome, les ARN codant pour les récepteurs P2RY1, P2RY2 et le niveau d'expression de leurs protéines correspondantes sont fortement augmentés. L'incubation des cellules de mélanome en présence d'agoniste de P2RY1 permet de bloquer la prolifération cellulaire alors qu'à l'inverse, la stimulation de P2RY2 l'augmente (White et al., 2005). Dans le cancer du col de l'utérus, l'expression des récepteurs P2Y6 et P2Y4 est augmentée, et leur stimulation induit aussi la prolifération cellulaire (Okuda et al., 2003).

b3. P2RY2 et mucoviscidose

En plus de son implication dans l'invasion tumorale pulmonaire, le P2RY2 régule la sécrétion de chlore et l'absorption de sodium au sein des cellules épithéliales des bronchioles dans les poumons (Inglis et al., 1999). Et l'activation du P2RY2 par l'ATP permet la régulation de la sécrétion d'ions (Cl^- et Na^+), de mucine et de surfactant au sein de l'épithélium respiratoire. Plusieurs études montrent que des agonistes du récepteur P2RY2 peuvent suppléer aux fonctions défectueuses de la protéine CFTR. En effet, cette protéine est un canal ionique



Patnaik *et al.*, 2014

Figure 28: Approche schématique du diagnostique différentiel de la monocytose présente dans le sang périphérique. Lorsque des patients présentent une monocytose périphérique, un diagnostique différentiel est effectué afin d'en déterminer la cause. Ainsi, si la monocytose est supérieure à 3 mois, qu'il n'y a pas de mutation BCR-ABL ni de réarrangement des gènes PDGFRA et PDGFRB et que le nombre de blastes sanguins et médullaires est strictement inférieur à 20% il s'agit d'une LMMC, sinon le diagnostique s'orientera plus vers une autre myélodysplasie telle que la Leucémie Aigue Myéloïde (LAM). Lorsque la LMMC est diagnostiquée, le pourcentage de blastes périphériques permet de classer les patients en deux sous groupes: ceux inférieurs à 5% de blastes circulants les LMMC de type 1 (LMMC-1) et ceux supérieurs à 5%, les LMMC de type 2 (LMMC-2) .

muté chez les patients atteints de mucoviscidose, lequel est responsable de l'hyperabsorption de sodium et par conséquent de l'épaississement du mucus caractéristique de la pathologie. L'activation du P2RY2 permettrait de restaurer la sécrétion de chlore et/ou d'inhiber l'absorption de sodium grâce à l'inhibition de l'expression du canal sodique ENaC. Ainsi, les agonistes de P2RY2 permettraient de stimuler d'avantage l'élimination du mucus dans les bronches de patients souffrant de mucoviscidose (Burnstock et al.).

L'efficacité et l'innocuité de l'agoniste du P2RY2, le Denufosol, a été évalué dans plusieurs essais cliniques, cependant, les patients suivis sur le long terme ne présentent pas d'amélioration de leur fonction pulmonaire (Deterding et al., 2007; Ratjen et al.).

V - Leucémie MyéloMonocytaire Chronique

A. Généralités sur la LMMC

La leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC) est une maladie clonale de la cellule souche hématopoïétique. Selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) cette hémopathie est caractérisée par plusieurs critères, dont 1) une monocytose périphérique persistante de plus de 3 mois ($>1.10^9/L$), 2) l'absence du chromosome Philadelphie et du gène de fusion BCR-ABL, 3) l'absence du réarrangement de gène PDGFRB, 4) d'une blastocytose sanguine et médullaire $<20\%$, et enfin 5) d'une dysplasie touchant au moins une des populations cellulaires issues de la lignée myéloïde.

Le pourcentage de blastes dans la moelle permet de distinguer deux sous-groupes de patients, les LMMC de type 1 qui présentent un pourcentage de blastes sanguin inférieur à 5% et un pourcentage de blastes médullaires inférieur à 10% et les LMMC de type 2 caractérisées par un pourcentage de blastes sanguin et/ou médullaires supérieur à 10% mais inférieur à 20% (**Figure 28**).

La LMMC est une maladie rare, dont l'incidence est de 1 à 5 nouveaux cas/100 000 habitants par an. Cette hémopathie affecte essentiellement les sujets âgés de plus de 60 ans avec une moyenne d'âge d'apparition de 70 ans avec une médiane de survie 20 à 40 mois. La LMMC atteint préférentiellement l'homme (Sex Ratio : 2H/1F) et se transforme dans 15% à 30% des cas en Leucémie Aigue Myéloïde (LAM). La LMMC représenterait 10 % de l'ensemble des syndromes myélodysplasiques (Parikh and Tefferi).

Depuis 2001, la LMMC est classée dans la catégorie des syndromes myélodysplasiques mais également myéloprolifératifs. En effet, elle présente à la fois les critères d'un syndrome myélodysplasique puisque une ou plusieurs lignées myéloïdes sont affectées et aussi des caractéristiques myéloprolifératives puisque l'on retrouve un très grand nombre de monocytes dans le sang. Cette monocytose est caractérisée par une augmentation des monocytes classiques au détriment des monocytes non classiques et intermédiaires (Selimoglu-Buet et al.). Par ailleurs, une autre caractéristique de la pathologie est la présence dans le sang des patients, d'une population de granulocytes immatures.

B. La physiopathologie de la LMMC

Malgré l'existence des critères cliniques qui permettent de diagnostiquer la LMMC, l'origine de cette maladie reste encore mal connue. Grâce au séquençage haut débit des cellules de patients atteints de LMMC, certaines mutations génétiques ont pu être mises en évidence.

1. Les anomalies associées

a. Les causes cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques sont communes chez les patients souffrants de LMMC et sont présentes dans 20-40% des patients (Onida et al., 2002), (Such et al.). Une étude cytogénétique portant sur des patients d'origine espagnole montre qu'ils présentent un caryotype normal dans 73% des cas (Such et al.). Les altérations génétiques les plus fréquentes sont la trisomie 8, la délétion 5q, la trisomie 10, la délétion 11q et 12q, les trisomies 19 et 21, des aberrations du chromosome 7 et des caryotypes complexes.

Ces critères cytogénétiques ont permis de stratifier les patients en trois groupes : les patients ont été divisés en trois groupes : les patients de hauts risques (trisomie 8, anomalie du chromosome 7 et caryotype complexe), les patients de risque intermédiaire (tout sauf les hauts risques) et les patients de faible risque (caryotype normal ou perte du chromosome Y). La survie globale à 5 ans pour ces patients est de respectivement 4%, 26% et 35%.

Gènes	Fréquences	
TET2	58%	Régulateurs de la méthylation de l'ADN
SRSF2	46%	Facteurs d'épissage
ASXL1	40%	Enzymes modifiant les histones
RUNX1	15%	Facteurs de transcription
NRAS	11%	Molécules impliquées dans les voies de signalisation
CBL	10%	
JAK2	8%	
KRAS	8%	
ZRSF2	8%	
IDH2	6%	Régulateurs de la méthylation de l'ADN
SF3B1	6%	Facteurs d'épissage
U2AF35	5%	
EZH2	5%	Enzymes modifiant les histones
FLT3	3%	Molécules impliquées dans les voies de signalisation
DNMT3A	2%	Régulateurs de la méthylation de l'ADN
NPM1	1%	
IDH1	<1%	Régulateurs de la méthylation de l'ADN
KIT	<1%	Molécules impliquées dans les voies de signalisation
TP53	1%	Facteurs de transcription

Itzkson *et al.*, 2013

Tableau 9 : Fréquences des principaux gènes retrouvés mutés dans les cas de LMMC. Durant ces dernières années, de nombreuses mutations génétiques ont été mise en évidence dans le cadre de la LMMC. Les gènes les plus fréquemment mutés dans cette hémopathie sont présentés dans le tableau ci-dessus. La fonction des protéines codée par ces gènes est renseignée par la couleur de la case.

b. Les mutations génétiques

Par ailleurs, des mutations génétiques ont été identifiées dans près de 90% des patients atteints de LMMC.

Ces mutations peuvent être classées en 3 grandes catégories celles impliquées dans l'expression des gènes régulant la synthèse de l'ADN, celles impliquées dans la voie du spliceosome et enfin, celles impliquées dans la régulation facteurs de transcription (**Tableau 9**).

b1. Les mutations dans les gènes régulant la synthèse de l'ADN

Les mutations des gènes impliqués dans la régulation épigénétique peuvent être classées en deux groupes : celles affectant la méthylation de l'ADN et celles régulant les modifications de la chromatine.

b1.1. Les mutations affectant la méthylation de l'ADN

Parmi cette catégorie, TET2 (Ten-Eleven Translocation 2) est le gène le plus fréquemment affecté puisqu'il est muté chez plus de la moitié des patients. TET2 code pour une dioxygénase qui catalyse la conversion de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (h5mC), un nucléotide intermédiaire dans la voie de déméthylation de l'ADN. Ainsi, la mutation de TET2 induit une perte de fonction de cette protéine, ce qui se traduit par une augmentation de la forme 5mC et donc une hyperméthylation de l'ADN (Ko et al.). Toutefois, les conséquences des mutations de TET2 sur la méthylation du génome sont encore controversées. En effet, les patients mutés pour TET2 peuvent être à la fois hypo- ou hyper-méthylés, indiquant qu'il n'y a pas de réel lien de causalité entre la mutation de TET2 et le statut de méthylation (Perez et al.). Par ailleurs, *in vivo* comme *in vitro*, la perte de fonction de TET2 conduit à l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques avec une expansion progressive ainsi qu'à l'augmentation de la différenciation granulocytaire ((Moran-Crusio et al., 2011); (Moniuszko et al., 2009)). Cette observation met en évidence que les mutations de TET2 sont responsables de l'émergence d'un clone leucémique, élément clé de l'initiation de la pathogénese de la LMMC (Itzykson et al.).

Par ailleurs, TET2 possède une activité dioxygénase dépendante du 2-OG (2-Oxoglutarate) et Fe(II). Les 2-OG sont générés grâce aux isocitrates déshydrogénases (IDH1 à IDH3) qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en 2-OG. L'enzyme IDH2 est mutée dans 8-10% des patients atteints de LMMC ce qui a pour conséquence d'inhiber de nombreuses enzymes dépendante du 2-OG dont l'activité dioxygénase de TET2. IDH2 étant dans la même voie que TET2, ceci explique en partie pourquoi le taux de 5hmC est diminué chez certain patients qui ne présentent pas de mutation pour TET2 et également pourquoi le profil de méthylation des génomes des patients mutés TET2 ou IDH2 sont proches (Figuerola et al.).

Enfin, des mutations de la DNA Méthyl-Transférase 3 (DNMT3A) ne sont retrouvées que très rarement (<10%). Ces mutations affectent la méthylation du génome ce qui conduit à une diminution de l'expression génique. L'association des mutations de TET2 et DNMT3A dans la même pathologie est inattendue puisque ces deux enzymes ont des effets opposés sur la méthylation de l'ADN.

b1.2. Les mutations affectant les histones

ASXL1 (additionnal sex combs like 1) est retrouvé muté chez 40% des patients. Son rôle est de déubiquitinyler l'histone A2 sur la lysine 119 (H2AK119). Les mutations d'ASXL1 observées chez les patients sont des mutations pertes de fonction qui causent une dérégulation transcriptionnelle consécutives à des triméthylations de l'histone H3 sur sa lysine 27 (H3K27). La triméthylation de H3K27 (H3K27me3) est un marqueur qui, une fois présent sur la chromatine, induit l'extinction de la transcription. Ainsi, les mutations d'ASXL1 induisent une augmentation de la transcription. De plus, ASXL1 interagit directement avec le complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2) composé entre autre de EZH2 (gènes mutés dans 5-10% des cas) (Abdel-Wahab et al.).

EZH2 est une histone-méthyltransférase, dont l'activité principale est de triméthyler H3K27 et sa mutation qui conduit à la perte de son activité. Celle-ci est retrouvée mutée chez 5-10% des patients.

Les mutations d'ASXL1, comme celles d'EZH2 perturbent la formation du complexe PRC2 avec ASXL1 ce qui conduit à la perte de la triméthylation des histones et donc à la levée de l'inhibition de la transcription (Ernst et al.; Nikoloski et al.).

b2. Les mutations impliquées dans la voie du spliceosome

Les mutations affectant la machinerie de l'épissage des ARNm, sont des mutations exclusives détectées dans plus de 60% des cas de LMMC. Le gène le plus communément muté est *srsf2* (environ 50% des cas) (Yoshida et al.). Les mutations de ce gène se situent à proximité du résidu « hotspot » Proline 95 et sont plus fréquentes dans la LMMC que dans les autres types de myélodysplasies. De plus, ces mutations sont souvent associées à des mutations de TET2 (Cazzola et al.; Itzykson et al.; Meggendorfer et al.).

Les mutations de ZRSR2, U2AF1 ou SF3B1 qui sont des protéines également impliquées dans l'épissage alternatif, se retrouve chez au moins 10% des patients. Tous ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la reconnaissance du site 3' lors de la maturation des pré-ARNm. L'altération de ces éléments du spliceosome conduit à une instabilité génomique et à une dérégulation de la machinerie épigénétique. Toutefois, à l'heure actuelle peu de choses sont connues quant aux conséquences cellulaires et moléculaires de ces mutations (Alexander and Beggs).

b3. Les mutations des facteurs de transcription

Le facteur de transcription RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse normale. RUNX1 régule la différenciation myéloïde grâce à l'activation de PU.1 qui permet la régulation de la différenciation érythrocytaire, granulocytaire mais également l'initiation de la différenciation monocyttaire. Dans la LMMC, RUNX1 est muté chez environ 10% des patients. (Gelsi-Boyer et al., 2008). Les mutations trouvées sont de divers types (non sens ou faux sens) et touchent préférentiellement la partie C-terminale de la protéine. Ces mutations sont souvent associées à une thrombocytopénie et favoriseraient la transformation de la LMMC en LAM (Kuo et al., 2009).

2. Une signalisation cellulaire altérée

Les gènes codants pour des facteurs de transcription ou pour des protéines nécessaires à l'épissage alternatif ne sont pas les seuls gènes mutés dans la LMMC. En effet, il a été trouvé que certains gènes codants pour différentes protéines impliquées dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires aussi bien que des petites protéines G pouvaient être mutées.

a. Les mutations de RAS

Les mutations du gène RAS ont été identifiées au début des années 1990 puis sont longtemps restées les seules mutations connues dans la LMMC (Gow et al., 1988; Padua et al., 1988). Les protéines RAS, NRAS, KRAS, et HRAS sont des petites protéines G (actives sous leur forme liée au GTP) qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaire à travers l'activation de MAPKines qu'elles induisent. Les mutations de RAS bloquent la protéine RAS sous sa forme active, conduisant ainsi à l'activation constitutive des voies de signalisation MEK/MAPK, PI3K/AKT et STAT5.

Les mutations NRAS et KRAS sont chacune présentes chez environ 10% des patients, elles sont à l'origine de leur hyperleucocytose. L'hyperplasie granulocytaire et monocyttaire observée chez les patients est la conséquence des mutations de RAS qui rendent la voie MAPK constitutivement active mais résulte aussi de l'hypermotilité des précurseurs granulo-monocytaires au GM-CSF et à l'IL-3 et d'une activation constitutive de ERK et STAT5. Même si les mutations affectant les gènes RAS restent les plus fréquentes, les mutations affectant des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que CBL, JAK2 ou FLT3 peuvent aussi être mutées. Les mutations NRAS, KRAS et CBL sont mutuellement exclusives, alors que JAK2 et FLT3 peuvent être associées aux précédentes.

b. Les mutations de CBL

Le gène *cbl* code pour 3 protéines à activité ubiquitine ligase : c-CBL, CBL-b et CBL-c. Dans le compartiment hématopoïétique, CBL est fortement exprimée dans les cellules souches où elle permet l'auto-renouvellement des précurseurs. Quant à l'expression de CBL-b, elle augmente au cours de la différenciation myéloïde (Rathinam et al.). Après sa liaison à un récepteur tyrosine kinase activé tel que c-Kit, FLT3, CSF-1R, PDGF-R ou T/BCR, CBL favorise d'abord le recrutement de molécules de signalisation, puis contribue à l'endocytose du récepteur conduisant à sa dégradation. CBL induit grâce à son activité ubiquitine ligase, l'ubiquitination des kinases SFK, JAK2 ou encore STAT5, ce qui conduit à l'inhibition de la voie JAK/STAT, lui conférant le rôle de gène suppresseur de tumeur. Dans le cadre de la LMMC, CBL est muté chez 10% des patients. Les protéines CBL mutées perdent leur activité catalytique ce qui conduit à l'absence de la dégradation des protéines de signalisation, aboutissant ainsi au maintien de l'activation de la voie de signalisation STAT5 ce qui a pour

conséquence de provoquer une hypersensibilité aux cytokines tel que le GM-CSF (Naramura et al.).

c. La mutation JAK2 V617F

La mutation V617F de la Janus Kinase 2 (JAK2) est une mutation fréquente des syndromes myélodysplasiques et elle est présente chez 10% des patients souffrants de LMMC (Levine et al., 2005). Cette mutation augmente l'activité basale de cette kinase ce qui engendre non seulement la suractivation des voies STAT5 et PI3K mais également à une hypersensibilité aux cytokines telles que l'EPO, la TPO ou le G-CSF (Ungureanu et al.) (Vainchenker and Constantinescu).

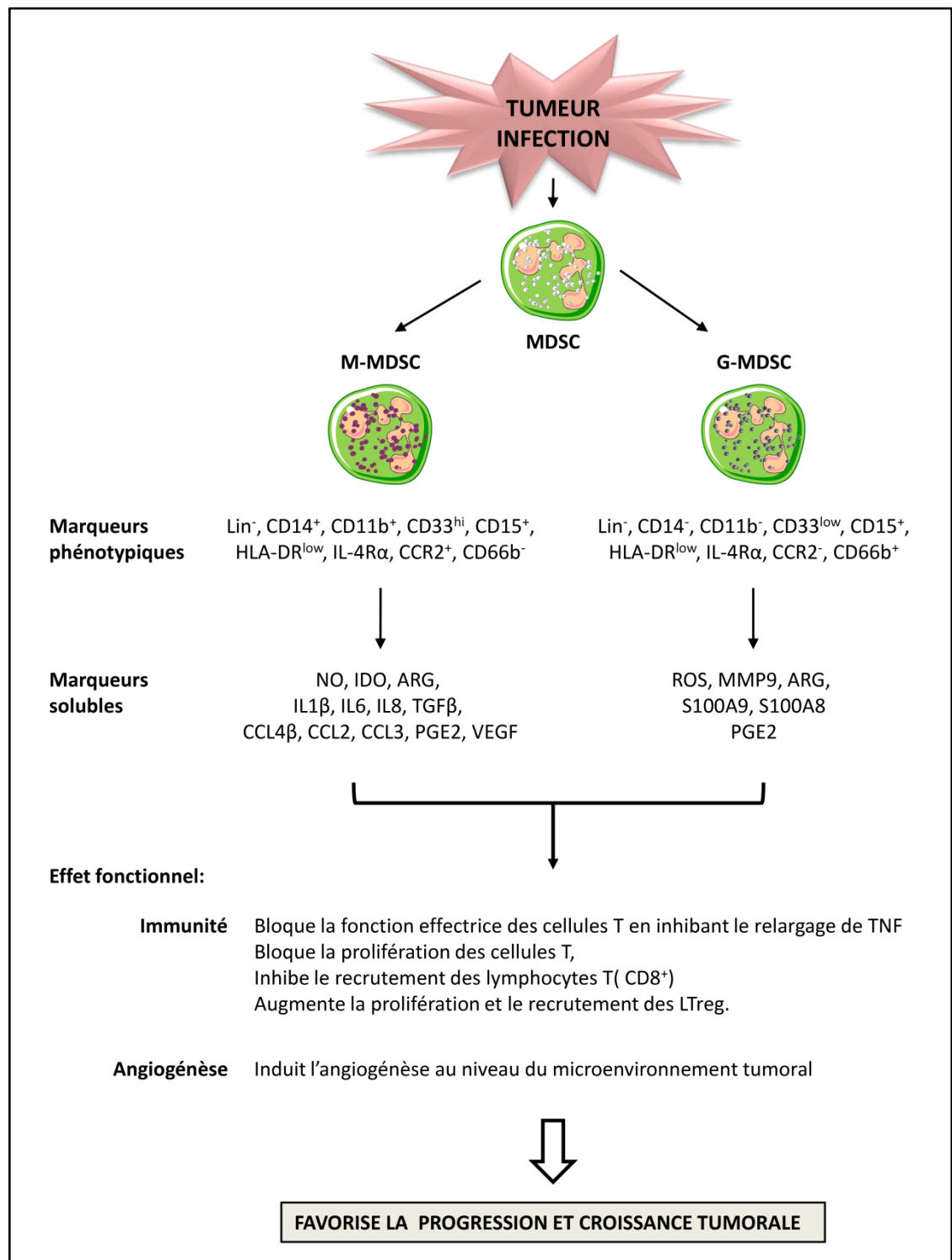
d. Les mutations FLT3

Enfin, il existe des mutations activatrices du récepteur tyrosine Kinase FLT3 (Fms-Like Tyrosine Kinase 3), cependant elles sont très rares puisque retrouvées dans seulement 3% des LMMC.

C. La composante immunitaire : Les MDSC

1. Définitions

Les Myeloid-derived suppressor cells ou MDSC correspondent à une population hétérogène de cellules d'origine myéloïde comprenant des progéniteurs macrophagiques, granulocytaires, de cellules dendritiques et des cellules myéloïdes immatures. (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). En condition physiologique, les MDSC représentent 20-30% des cellules de la moelle osseuse et environ 4% des cellules nucléées de la rate (Youn et al., 2008). Normalement, ces cellules immatures migrent de la moelle vers les différents organes et se différencient en macrophages, en granulocytes ou en cellules dendritiques. Dans certains contextes, comme les infections ou après une greffe de moelle osseuse, les MDSC s'accumulent dans le sang, les organes lymphoïdes, la rate et au sein des tissus tumoraux. Dans cette partie, il ne sera développé que les caractéristiques des MDSC dans le contexte tumoral. Cependant, les propriétés immuno-suppressives des MDSC présentes dans le sang



Adapté de Tang *et al.*, 2012

Figure 29: Caractéristiques phénotypiques des MDSC. Dans certaines conditions pathologiques telles que les infections ou les cancers, les MDSC se retrouvent anormalement présentes dans le sang périphérique, au niveau des organes lymphoïdes secondaires mais également au sein du tissu tumoral. Les MDSC sont une population hétérogène de cellules myéloïdes qui se compose de 2 sous-ensembles principaux: les monocytaires (M-MDSC) et les granulocytaires (G-MDSC), caractérisés par des marqueurs phénotypiques spécifiques. Les MDSC sécrètent des facteurs immunosuppresseurs qui inhibent la réponse immunitaire et anti-tumorale, en bloquant notamment la prolifération des lymphocytes T, en augmentant la prolifération et le recrutement des LT régulateurs (LTreg) et en favorisant l'angiogenèse. Les MDSC grâce à leurs propriétés immunosuppresseuses et pro-angiogéniques favorisent donc la croissance tumorale, elles sont donc généralement associées à un mauvais pronostic chez les patients.

périphérique en condition d'infections ou post-greffes sont similaires à celles décrites dans le contexte tumoral.

2. Caractérisation des MDSC tumorales

La présence de MDSC dans le sang périphérique des patients souffrant de cancer a été démontrée il y a près de 20 ans (Pak et al., 1995). La diversité des MDSC rend leur étude compliquée. Les premières études ont détectée une augmentation du nombre de cellules myéloïdes dans le sang des patients atteints de carcinome squameux de la tête et du cou. Ces cellules ont été décrites comme des cellules immatures exprimant le CD34 et ayant la capacité de d'inhiber les fonctions des lymphocytes T (Garritty et al., 1997; Pandit et al., 2000). L'utilisation de différentes combinaisons d'anticorps en cytométrie en flux a permis de mieux caractériser les MDSC des patients. Elles sont généralement positives pour le CD33 et le CD11b et négatives pour le HLA-DR. De plus, ces MDSC humaines peuvent être divisées en 2 groupes distincts, les MDSC monocytaires ou M-MDSC qui expriment le CD14 (HLA-DR⁻ CD33^{hi} CD14⁺CD15⁻) et les MDSC granulocytaires ou G-MDSC qui expriment le CD15 (HLA-DR⁻ CD33^{lo} CD14⁻CD15⁺). Toutefois, certaines MDSC ne sont ni granulocytaires ni monocytaires, comme dans le cas des carcinomes rénaux, où cette population n'exprime ni le CD14 ni le CD15 (HLA-DR⁻ CD33^{hi} CD14⁻CD15⁻) (Ko et al.) (**Figure 29**).

D'autres marqueurs peuvent être utilisés pour identifier les MDSC humaines comme l'expression du CD45, des niveaux élevés du récepteur de l'IL-4 (IL-4Rα) ou du récepteur au VEGF (flt-1) ainsi que la faible l'expression du CD62 et du CD16 (Mandrizzato et al., 2009; Peranzoni et al.; Rodriguez et al., 2009).

3. Fonctions Immunosuppressives des MDSC

Les mécanismes conduisant à l'accumulation des MDSC dans le sang des patients restent encore inconnus. Cependant, les cellules cancéreuses pourraient jouer un rôle dans cette accumulation. En effet, les cellules tumorales sécrètent de forte quantité de cytokines et de facteurs chimioattractants. Ainsi, la concentration de molécules pro-inflammatoires telles que le GM-CSF, IL-13, le VEGF, l'IL-10, l'IL-8, mais également la concentration d'alarmines S100A8/A9 qui appartiennent à la famille des DAMPs ou encore la concentration de Prostaglandine E2 (PGE2), molécule pro-inflammatoire impliquée dans l'inhibition fonctionnelle de nombreuses cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, T, Naturals

Killers) sont très fortement augmentées dans le plasma des patients. L'ensemble de ces molécules favorise l'attraction et l'accumulation des MDSC dans leur sang (Young et al., 2001) (Gabitass et al.) (Arihara et al.) (Rudolph et al.) (Wang et al.) (Obermajer et al.).

Une fois présentes dans le sang ou au sein de la tumeur, les MDSC vont exercer une activité immunosuppressive. L'immunosuppression est une des caractéristiques biologiques les plus importantes des MDSC. Cette propriété fonctionnelle est principalement médiée par l'activation de STAT1, STAT3 et STAT6 ainsi que par NF- κ B (Ochoa et al., 2007; Vasquez-Dunddel et al.). L'activation de ces voies de signalisation va conduire à la production d'Arginase1, de iNOS (production de NO), d'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) et de la NADPH oxydase (production de ROS) qui va permettre la création d'un microenvironnement immunosuppresseur et pro-tumoral (Albeituni et al.).

Par ailleurs, les MDSC peuvent supprimer l'activité cytotoxique des lymphocytes T grâce à différents mécanismes notamment par leur forte production de NO ou de ROS. De plus, grâce à leur sécrétome, les MDSC vont bloquer la sécrétion d'IFN γ et d'IL-2 des lymphocytes T, cytokines indispensables à leur prolifération (Huang et al.; Mao et al.) (Schmielau and Finn, 2001). Les Lymphocytes T ne sont pas les seules cellules immunitaires à être inhibées par les MDSC. En effet, la présentation des peptides antigéniques par les cellules dendritiques, l'activation des Natural Killers ou encore la régulation du nombre de Lymphocytes T régulateurs est aussi affectée.

4. MDSC et hémopathies malignes

Depuis quelques années, des études montrent l'existence de MDSC dans les hémopathies telles que le myélome multiple, les lymphomes ou encore dans certaines leucémies (Lin et al.) (Christiansson et al.; Jitschin et al.).

a. Les MDSC dans le Myélome multiple

Le myélome multiple est caractérisé par l'accumulation de plasmocyte dans la moelle osseuse et la présence d'immunoglobulines monoclonales dans le sang des patients. LE MM représente 1% des cancers et 13% des cancers hémathopoïétiques. La survie des patients a été améliorée grâce à l'utilisation de nouvelles molécules comme le Bortezomib, un inhibiteur du protéasome ou d'agents immunorégulateurs, comme le Lenalidomide, qui sont

utilisés en combinaison avec des agents alkylants tels que le Melphalan ou avec de la Dexaméthasone (Bergsagel et al.). Malgré l'efficacité de ces molécules, les patients rechutent ou deviennent réfractaires aux traitements, indiquant la nécessité de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans cet esprit, l'équipe de Jo A. Van Ginderachter s'est intéressée à l'implication des MDSC dans le myélome multiple. Très rapidement dans la moelle osseuse de leur modèle murin de myélome multiple, un remaniement cellulaire est observé. En effet, en plus des MDSC normalement présentes dans la moelle, ils observent l'apparition d'une population de M-MDSC qui exprime très fortement le CD11b et faiblement le Ly6G (marqueurs granulocytaire). Cette population est très hétérogène et est composée de monocytes inflammatoires, d'éosinophiles et de cellules myéloïdes immatures. Toutes ces populations contribuent à la suppression des Lymphocytes T, toutefois, la population monocyttaire semble être la plus immunosuppressive. (Van Valckenborgh et al.)

Une autre équipe a confirmé l'importance de ces MDSC dans la pathogénèse du MM. En effet, les souris invalidées pour S100A9, une protéine dont l'expression est augmentée dans les MDSC, montrent un retard dans le délai d'apparition du MM par rapport aux souris contrôles, démontrant ainsi l'importance des MDSC et du S100A9 dans l'établissement de cette hémopathie (Cheng et al., 2008).

Le rôle du S100A9 n'est pas restreint au MM. En effet, sa surexpression au sein des précurseurs myéloïdes (sous le promoteur de c-Kit) dans des souris transgéniques inhibe la différenciation des macrophages, des cellules dendritiques et induit une accumulation de cellules immatures myéloïdes dans la moelle. De la même manière que les MDSC présentes dans le contexte tumoral, les cellules qui sur-expriment S100A9 possèdent une puissante action immunosuppressive sur les LT (Cheng et al., 2008).

b. Les MDSC dans les Leucémies

Les leucémies sont caractérisées par une prolifération anormale des cellules immunitaires immatures. L'étude des MDSC dans les leucémies reste limitée. Toutefois, la présence de MDSC dans le sang de patients souffrant de Leucémie Myéloïde Aigüe ou de Leucémie Myéloïde Chronique a été observée. Dans les deux cas, la présence de cellules CD11b⁺

CD33⁺HLA-DR⁻CD14⁻, est corrélée avec une augmentation de l'expression de ARG1 (Christiansson et al.).

Dans un autre type de leucémie, la Leucémie Lymphoïde Chronique, des cellules exprimant les marqueurs myéloïdes CD11b⁺ CD33⁺HLA-DR⁻CD14⁺CD11c mais aussi le CD115 (CSF-1R), et l'IL-4R α sont présentes dans le sang des patients et sont associées à une activité immunosuppressive (Jitschin et al.).

Par ailleurs, la présence de MDSC et d'un fort niveau d'ARG1 dans le sang des patients atteints de cancers sont souvent associés à de très mauvais pronostic (Gey et al.).

c. Les MDSC dans la LMMC

Bien que la monocytose persistante soit un des critères majeurs de la LMMC, cette hémopathie est aussi caractérisée par une hyperplasie de la lignée granulocytaire. En effet, le clone leucémique transformé génère à la fois une accumulation de monocytes mais aussi de cellules granuleuses dysplasiques immatures qui sont fréquemment détectées dans le sang périphérique des patients souffrant de LMMC. Ces granulocytes immatures n'expriment pas les marqueurs de surface de la lignée monocyttaire (CD14) mais plutôt des marqueurs granulocytaires tels que le CD15 ou le CD24. En fonction des clones leucémiques, et de leurs propriétés immunosuppressives, ces granulocytes immatures peuvent inhiber la différenciation macrophagique induite par le CSF-1 grâce à la sécrétion de grandes quantités de peptides anti-microbiens, les α -défensines qui vont interagir avec un récepteur purinergique, le P2RY6 exprimé à la surface des monocytes.

D. Traitements

Depuis la découverte de cette maladie dans les années 1980, les stratégies de traitements sont adaptées aux risques et au profil de chaque patient. A ce jour, le seul traitement curatif existant est l'allogreffe. Toutefois, sa pratique étant limitée dans le cadre de la LMMC, une approche pharmacologique est préconisée, ainsi des agents déméthylants ou cytotoxiques sont utilisés. Toutefois, ces agents n'éliminent que les symptômes de la maladie en ciblant l'hyperplasie cellulaire.

1. L'allogreffe

L'allogreffe est le seul traitement curatif, cependant cette intervention est très peu réalisée. En effet, les critères d'éligibilité pour la transplantation de moelle osseuse sont très restreints. Un des principaux critères est l'âge du patient. Or la LMMC étant une pathologie de la personne âgée, les patients sont rarement éligibles à la greffe de moelle osseuse. Toutefois, pour les patients éligibles à la greffe, les risques de rejet et de rechutes sont très élevés. Ainsi, 35 % des patients rejettent le greffon et décèdent, 25% des patients rechutent (1,5 à 22 mois post- greffe) et seulement 40% des patients sont toujours en rémission 68 mois après l'intervention (Bacher et al.) (Kerbaux et al., 2005).

2. Les agents thérapeutiques pharmacologiques

Pour les patients ne pouvant pas être greffés, le traitement de référence utilisé dans la LMMC est l'hydroxyurée. L'hydroxyurée est un inhibiteur de la ribonucléotide-réductase, qui va donc agir en bloquant la synthèse des désoxyribonucléotides. Elle entrave donc la replication de la synthèse d'ADN et affecte en priorité les cellules à divisions rapides, soit les cellules cancéreuses. Cette molécule agit donc comme un agent cytotoxique myélosuppresseur. Les patients traités par l'hydroxyurée montrent une amélioration de leur médiane de survie, qui est de 20 mois contre 9 mois seulement pour les patients traités par de l'étoposide (Wattel et al., 1996).

Les agents déméthylants comme l'Azacitidine ou la Décitabine sont efficaces dans le traitement des syndromes myélodysplasiques. L'Azacitidine est aussi utilisée dans le traitement de la LMMC. Les patients traités par de l'Azacitine ont une médiane de survie nettement améliorée (13 mois contre 9 mois pour le groupe contrôle). Par ailleurs, cette survie semble d'autant plus augmentée dans le groupe de patient ayant une forme de LMMC myélodysplasique comparé à ceux ayant une forme myéloproliferative.

D'autre part, plusieurs essais cliniques ont démontré l'efficacité de la Décitabine. En effet, les patients souffrant de LMMC traités par de la Décitabine présentent eux aussi une médiane de survie augmentée. Toutefois, malgré ces résultats prometteurs, l'Agence Européenne du médicament a restreint son utilisation au traitement *de novo* des LAM.

D'autres agents ont été testés seuls, ou en combinaison avec ces agents déméthylants. Ces molécules comprennent des inhibiteurs des histones déacétylases (Panobinostat, Vorinostat) ou des inhibiteurs de farnesyl transférase, ciblant l'activation de RAS (Tipifarnib, Lornafanib). Actuellement, le GSK212, un inhibiteur de MEK, est testé dans un essai clinique de phase II chez les patients atteints de LMMC et présentant une mutation de RAS. De plus, certains patients présentent une hypersensibilité au GM-CSF (dépendante de l'activation de STAT5), c'est pourquoi dans le cadre de la thérapie, des anticorps ciblant le GM-CSF sont en train d'être développés.

RESULTATS

Résumé de l'article 1

Autophagy is required for CSF-1–induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions.

Arnaud JACQUEL, Sandrine OBBA, Laurent BOYER, Maëva DUFIES, Guillaume ROBERT, Pierre GOUNON, Emmanuel LEMICHEZ, Frederic LUCIANO, Eric SOLARY, and Patrick AUBERGER.

Article publié dans le journal **BLOOD**, 2012

Depuis plusieurs années, l'autophagie est décrite comme un acteur majeur de divers processus de différenciation cellulaire. Suite à ces observations, nous avons également souhaité nous intéresser à la différenciation macrophagique physiologique des monocytes humains et vérifier la présence ou non d'autophagie au cours de ce processus de différenciation.

Le processus de différenciation macrophagique peut être reproduit *ex vivo* à partir de monocytes primaires isolés du sang périphérique de sujets sains (collaboration EFS Alpes-Méditerranée) par tri magnétique et exposés au CSF-1. Une analyse en microscopie électronique de monocytes mis en différenciation a permis ainsi de mettre en évidence la formation de vésicules à double membranes qui sont caractéristiques de l'induction d'un processus d'autophagie. L'utilisation de la microscopie électronique montre par ailleurs la présence d'autophagosomes entourant notamment des mitochondries 2 jours après l'ajout de M-CSF (mitophagie). D'autres marqueurs caractéristiques de l'induction d'un processus d'autophagie ont pu être également visualisés au cours de la différenciation macrophagique des monocytes et notamment la conversion de la protéine Atg8 cytosolique (LC3-I) en une forme membranaire (LC3-II) mais également l'activation des cathepsines, protéases lysosomales exécutrices de l'autophagie.

La nécessité de la mise en place du processus d'autophagie au cours de la différenciation macrophagique des monocytes a pu être confirmée grâce à l'utilisation de siRNA dirigés

contre des protéines impliquées dans les étapes précoces de l'autophagie (Beclin, ATG7 et ATG5) ainsi que par l'utilisation d'un modèle murin déficient pour l'autophagie dans le compartiment hématopoïétique (vav-Atg7^{-/-}). Enfin, nous avons également démontré que l'initiation de l'autophagie après stimulation du récepteur au M-CSF nécessitait l'activation de la sérine/thréonine kinase ULK1.

L'ensemble de ses résultats montre donc la nécessité de l'activation du processus autophagique dépendant de ULK1, pour l'obtention d'une différenciation macrophagique complète et fonctionnelle.

Résumé de l'article 2

The PRKAA1/AMPK α 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML.

Article accepté dans le journal **Autophagy**, 2015

Sandrine OBBA, Zoheir HIZIR, Laurent BOYER, Dorothée SELIMOGLU-BUET, Anja PFEIFER, Gregory MICHEL, Amine HAMOUDA, Diogo GONCALVES, Michaël CEREZO, Sandrine MARCHETTI, Stéphane ROCCHI, Nathalie DROIN, Thomas CLUZEAU, Guillaume ROBERT, Frederic LUCIANO, Bernard ROBAYE, Marc FORETZ, Benoit VIOLLET, Laurence LEGROS, Eric SOLARY, Arnaud JACQUEL[†], Patrick AUBERGER[†].

[†]: Contribution équivalente à ce travail

Après avoir mis en évidence la nécessité de l'autophagie au cours de la différenciation macrophagique, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation pouvant réguler et induire ce processus. Afin de disposer de tous les éléments nous avons inclus à cette étude la signalisation en aval du récepteur purinergique P2RY6. En effet, il avait été déjà décrit que ce récepteur était la cible des α -défensines (HNPs), peptides antibactériens sécrétés en excès par des granulocytes immatures présentant dans le sang périphérique des patients souffrant de la Leucémie MyéloMonocytaire Chronique. Dans ce contexte, les HNPs vont antagoniser le P2RY6 ce qui a pour conséquences un blocage de la différenciation macrophagique.

Dans un premier temps, nous avons observé que la stimulation des monocytes par le CSF-1 engendre à la fois la néo-synthèse et l'activation de l'AMPK et ceci dès les premières heures de stimulation par le CSF-1. Nous démontrons que cette activation de l'AMPK est

dépendante de la CaMKK β . En effet, son inhibition bloque l'induction de l'AMPK et de l'autophagie via l'inhibition de ULK1, démontrant ainsi l'importance de l'axe CaMKK β -AMPK dans l'induction de l'autophagie ULK1-dépendante.

Dans un second temps, afin de caractériser les voies en amont de la CaMKK β nous avons voulu étudier les phospholipases responsables de l'activation de la CaMKK β .

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et par des approches de siRNA nous avons démontré la nécessité de P2RY6 et de sa PLC associée, la PLC β 3. En effet, la stimulation du P2RY6 active la PLC β 3 qui est responsable de l'activation de l'axe CaMKK β -AMPK et par conséquent, de l'induction de l'autophagie nécessaire à la différenciation macrophagique.

Enfin, afin de vérifier si l'axe P2RY6-AMPK est altéré dans le contexte pathologique, nous avons étudié la différenciation macrophagique des monocytes issus de patients souffrants de LMMC. Nos résultats démontrent que l'expression de l'AMPK est bien altérée et par conséquent que la différenciation macrophagique est abolie. Dans ce contexte, l'ajout d'agonistes du P2RY6 est capable d'une part de réinduire l'expression de l'AMPK et d'autre part de restaurer la différenciation macrophagique.

A l'issue de cette étude, nous avons démontré que le P2RY6 *via* la stimulation du CSF-1R active l'axe PLC β 3-CaMKK β -AMPK-ULK1 conduisant à l'induction de l'autophagie nécessaire à la différenciation macrophagique. De plus, dans le contexte pathologique de la LMMC où les patients présentent de faibles concentrations de granulocytes immatures, la réactivation du P2RY6 conduit à la restauration de la différenciation macrophagique, désignant ainsi P2RY6 comme potentielle cible thérapeutique.

Revue 1

Proper macrophagic differentiation requires both autophagy and caspase activation.

Arnaud JACQUEL†, Sandrine OBBA†, Eric SOLARY and Patrick AUBERGER.

†: Contribution équivalente à ce travail

Revue publiée dans le journal **Autophagy**, 2012

Revue 2

Implication de l'autophagie au cours du développement et de la différenciation cellulaire.

Sandrine OBBA, Thomas CLUZEAU, Alexandre PUISSANT, Guillaume ROBERT, Frédéric LUCIANO, Patrick AUBERGER, Arnaud JACQUEL

Revue soumise au journal Hématologie

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

Abbracchio, M. P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64, 445-475.

Abbracchio, M. P., Ceruti, S., Bolego, C., Puglisi, L., Burnstock, G., and Cattabeni, F. (1996). Trophic roles of P2 purinoceptors in central nervous system astroglial cells. *Ciba Found Symp* 198, 142-147; discussion 147-148.

Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L. M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A. H., Pandey, S., Patel, J. P., Chung, Y. R., Koche, R., *et al.* (2012). ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 22, 180-193.

Adams, D. O. (1989). Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol Today* 10, 33-35.

Aita, V. M., Liang, X. H., Murty, V. V., Pincus, D. L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T. C., and Levine, B. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59, 59-65.

Albeituni, S. H., Ding, C., and Yan, J. (2013). Hampering immune suppressors: therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer J* 19, 490-501.

Alderton, F., Rakhit, S., Kong, K. C., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S., and Pyne, N. J. (2001). Tethering of the platelet-derived growth factor beta receptor to G-protein-coupled receptors. A novel platform for integrative signaling by these receptor classes in mammalian cells. *J Biol Chem* 276, 28578-28585.

Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32, 2-11.

Alexander, R., and Beggs, J. D. (2010). Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call? *Biochem Soc Trans* 38, 1251-1256.

Arihara, F., Mizukoshi, E., Kitahara, M., Takata, Y., Arai, K., Yamashita, T., Nakamoto, Y., and Kaneko, S. (2013). Increase in CD14+HLA-DR -/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 62, 1421-1430.

Aronoff, D. M., Canetti, C., and Peters-Golden, M. (2004). Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol* 173, 559-565.

Arsov, I., Adebayo, A., Kucerova-Levisohn, M., Haye, J., MacNeil, M., Papavasiliou, F. N., Yue, Z., and Ortiz, B. D. (2011). A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development. *J Immunol* 186, 2201-2209.

Auffray, C., Sieweke, M. H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

*B*acher, U., Haferlach, T., Schnittger, S., Kreipe, H., and Kroger, N. (2011). Recent advances in diagnosis, molecular pathology and therapy of chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 153, 149-167.

Baeten, D., Boots, A. M., Steenbakkers, P. G., Elewaut, D., Bos, E., Verheijden, G. F., Berheijden, G., Miltenburg, A. M., Rijnders, A. W., Veys, E. M., and De Keyser, F. (2000). Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43, 1233-1243.

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008). The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* 28, 5747-5763.

Bao, L., Locovei, S., and Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572, 65-68.

Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., and Sabatini, D. M. (2012). Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 1196-1208.

Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168, 3536-3542.

Bell, B. D., Leverrier, S., Weist, B. M., Newton, R. H., Arechiga, A. F., Luhrs, K. A., Morrisette, N. S., and Walsh, C. M. (2008). FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16677-16682.

Bergsagel, P. L., Mateos, M. V., Gutierrez, N. C., Rajkumar, S. V., and San Miguel, J. F. (2013). Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 121, 884-892.

Bergsbaken, T., and Cookson, B. T. (2007). Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog* 3, e161.

Betin, V. M., and Lane, J. D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 122, 2554-2566.

Betin, V. M., MacVicar, T. D., Parsons, S. F., Anstee, D. J., and Lane, J. D. (2012). A cryptic mitochondrial targeting motif in Atg4D links caspase cleavage with mitochondrial import and oxidative stress. *Autophagy* 8, 664-676.

Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H., and Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274, 8335-8343.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15, 749-795.

Bolanos-Meade, J., Zhou, L., Hoke, A., Corse, A., Vogelsang, G., and Wagner, K. R. (2005). Hydroxychloroquine causes severe vacuolar myopathy in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Am J Hematol* 78, 306-309.

Bourette, R. P., Myles, G. M., Choi, J. L., and Rohrschneider, L. R. (1997). Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma2 by the M-CSF receptor is necessary for differentiation signaling. *Embo J* 16, 5880-5893.

Bourgin-Hierle, C., Gobert-Gosse, S., Therier, J., Grasset, M. F., and Mouchiroud, G. (2008). Src-family kinases play an essential role in differentiation signaling downstream of macrophage colony-stimulating factor receptors mediating persistent phosphorylation of phospholipase C-gamma2 and MAP kinases ERK1 and ERK2. *Leukemia* 22, 161-169.

Burnstock, G. (2006a). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27, 166-176.

Burnstock, G. (2006b). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S172-181.

Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64, 1471-1483.

Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D., and Timmermans, J. P. (2012). Purinergic signaling in the airways. *Pharmacol Rev* 64, 834-868.

Burnstock, G., and Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16, 433-440.

Camerer, E., Qazi, A. A., Duong, D. N., Cornelissen, I., Advincula, R., and Coughlin, S. R. (2004). Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104, 397-401.

Campas, C., Lopez, J. M., Santidrian, A. F., Barragan, M., Bellosillo, B., Colomer, D., and Gil, J. (2003). Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T lymphocytes. *Blood* 101, 3674-3680.

Cao, Y., Cai, J., Zhang, S., Yuan, N., Li, X., Fang, Y., Song, L., Shang, M., Liu, S., Zhao, W., *et al.* (2015). Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice. *Exp Hematol*.

Cathelin, S., Rebe, C., Haddaoui, L., Simioni, N., Verdier, F., Fontenay, M., Launay, S., Mayeux, P., and Solary, E. (2006). Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *J Biol Chem* 281, 17779-17788.

Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., and Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci* 15, 19700-19728.

Cattaneo, M. (2011). Molecular defects of the platelet P2 receptors. *Purinergic Signal* 7, 333-339.

Cazzola, M., Della Porta, M. G., and Malcovati, L. (2013). The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* 122, 4021-4034.

Chan, E. Y., Kir, S., and Tooze, S. A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 282, 25464-25474.

Chan, E. Y., Longatti, A., McKnight, N. C., and Tooze, S. A. (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157-171.

Chan, S. N., and Tang, B. L. (2013). Location and membrane sources for autophagosome formation - from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers. *Mol Membr Biol* 30, 394-402.

Chen, M. B., Wei, M. X., Han, J. Y., Wu, X. Y., Li, C., Wang, J., Shen, W., and Lu, P. H. (2014). MicroRNA-451 regulates AMPK/mTORC1 signaling and fascin1 expression in HT-29 colorectal cancer. *Cell Signal* 26, 102-109.

Cheng, P., Corzo, C. A., Luetke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M. M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., *et al.* (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med* 205, 2235-2249.

Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C. B. (2011). Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11121-11126.

Cheong, H., Nair, U., Geng, J., and Klionsky, D. J. (2008). The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19, 668-681.

Christiansson, L., Soderlund, S., Svensson, E., Mustjoki, S., Bengtsson, M., Simonsson, B., Olsson-Stromberg, U., and Loskog, A. S. (2013). Increased level of myeloid-derived suppressor cells, programmed death receptor ligand 1/programmed death receptor 1, and soluble CD25 in Sokal high risk chronic myeloid leukemia. *PLoS One* 8, e55818.

Colosetti, P., Puissant, A., Robert, G., Luciano, F., Jacquelin, A., Gounon, P., Cassuto, J. P., and Auberger, P. (2009). Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy* 5, 1092-1098.

Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M., and Boeynaems, J. M. (1997). Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 272, 31969-31973.

Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., and Lansbury, P. T., Jr. (2000). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 571-576.

Cooper, D. L., Martin, S. G., Robinson, J. I., Mackie, S. L., Charles, C. J., Nam, J., Isaacs, J. D., Emery, P., and Morgan, A. W. (2012). FcgammaRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One* 7, e28918.

Cowen, D. S., Berger, M., Nuttle, L., and Dubyak, G. R. (1991). Chronic treatment with P2-purinergic receptor agonists induces phenotypic modulation of the HL-60 and U937 human myelogenous leukemia cell lines. *J Leukoc Biol* 50, 109-122.

Cox, M. A., Gomes, B., Palmer, K., Du, K., Wiekowski, M., Wilburn, B., Petro, M., Chou, C. C., Desquitado, C., Schwarz, M., *et al.* (2005). The pyrimidinergic P2Y6 receptor mediates a novel release of proinflammatory cytokines and chemokines in monocytic cells stimulated with UDP. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 467-473.

Cuervo, A. M., Knecht, E., Terlecky, S. R., and Dice, J. F. (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol* 269, C1200-1208.

Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-1295.

Cuervo, A. M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* 24, 92-104.

Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49-63.

Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J. B., and Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 273, 2024-2029.

Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., and Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995.

Davis, C. W., and Lazarowski, E. (2008). Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respir Physiol Neurobiol* 163, 208-213.

de Vries, W. N., Binns, L. T., Fancher, K. S., Dean, J., Moore, R., Kemler, R., and Knowles, B. B. (2000). Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. *Genesis* 26, 110-112.

Delcourt, N., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* 28, 602-607.

Delgoffe, G. M., Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Heikamp, E., Meyers, D. J., Horton, M. R., Xiao, B., Worley, P. F., and Powell, J. D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* 12, 295-303.

Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 180, 451-458.

Derenne, S., Monia, B., Dean, N. M., Taylor, J. K., Rapp, M. J., Harousseau, J. L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100, 194-199.

Deterding, R. R., Lavange, L. M., Engels, J. M., Mathews, D. W., Coquillet, S. J., Brody, A. S., Millard, S. P., and Ramsey, B. W. (2007). Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 362-369.

Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., *et al.* (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 191, 155-168.

Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G., and Baricordi, O. R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587-600.

Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15, 305-309.

Droin, N., Jacquelin, A., Guery, L., Dufour, E., Garrido, C., and Solary, E. (2009). Various functions of caspases in hematopoiesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 2358-2371.

Droin, N., Jacquelin, A., Hendra, J. B., Racœur, C., Truntzer, C., Pecqueur, D., Benikhlef, N., Ciudad, M., Guery, L., Jooste, V., *et al.* (2010). Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 115, 78-88.

Dunn, W. A., Jr. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* 4, 139-143.

Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J. L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H., and Tschachler, E. (2008). Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol* 25, 831-841.

Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Tschachler, E. (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol* 115, 1148-1151.

Erlich, S., Mizrachi, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J. A., Stein, R., and Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy* 3, 561-568.

Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., *et al.* (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42, 722-726.

Erpenbeck, L., and Schon, M. P. (2010). Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* 115, 3427-3436.

Eskelinen, E. L. (2008). New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 266, 207-247.

*F*eng, W., Chang, C., Luo, D., Su, H., Yu, S., Hua, W., Chen, Z., Hu, H., and Liu, W. (2014). Dissection of autophagy in human platelets. *Autophagy* 10, 642-651.

Figuerola, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., *et al.* (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553-567.

Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2002). Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 722-726.

Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87, 373-377.

Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Pattingre, S., and Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1, 46-52.

*G*abitass, R. F., Annels, N. E., Stocken, D. D., Pandha, H. A., and Middleton, G. W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* 60, 1419-1430.

Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.

Garcia, R. A., Yan, M., Search, D., Zhang, R., Carson, N. L., Ryan, C. S., Smith-Monroy, C., Zheng, J., Chen, J., Kong, Y., *et al.* (2014). P2Y6 receptor potentiates pro-inflammatory responses in macrophages and exhibits differential roles in atherosclerotic lesion development. *PLoS One* 9, e111385.

Garrity, T., Pandit, R., Wright, M. A., Benefield, J., Keni, S., and Young, M. R. (1997). Increased presence of CD34+ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int J Cancer* 73, 663-669.

Gavard, J., and Gutkind, J. S. (2008). Protein kinase C-related kinase and ROCK are required for thrombin-induced endothelial cell permeability downstream from Galpha12/13 and Galpha11/q. *J Biol Chem* 283, 29888-29896.

Geisler, S., Holmstrom, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., and Springer, W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12, 119-131.

Geisler, S., Holmstrom, K. M., Treis, A., Skujat, D., Weber, S. S., Fiesel, F. C., Kahle, P. J., and Springer, W. (2010). The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 6, 871-878.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D. R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Aceto, N., Remy, V., Pinson, S., Houdayer, C., Arnoulet, C., Sainty, D., Bentires-Alj, M., *et al.* (2008). Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* 8, 299.

Geng, J., and Klionsky, D. J. (2008). The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9, 859-864.

Gey, A., Tadie, J. M., Caumont-Prim, A., Hauw-Berlemont, C., Cynober, L., Fagon, J. Y., Terme, M., Diehl, J. L., Delclaux, C., and Tartour, E. (2015). Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells inversely correlate with plasma arginine and overall survival in critically ill patients. *Clin Exp Immunol*.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., *et al.* (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 386, 619-623.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 392-404.

Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

Gow, J., Hughes, D., Farr, C., Hamblin, T., Oscier, D., Brown, R., and Padua, R. A. (1988). Activation of Ha-ras in human chronic granulocytic and chronic myelomonocytic leukaemia. *Leuk Res* 12, 805-810.

Grbic, D. M., Degagne, E., Langlois, C., Dupuis, A. A., and Gendron, F. P. (2008). Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. *J Immunol* 180, 2659-2668.

Guery, L., Benikhlef, N., Gautier, T., Paul, C., Jegou, G., Dufour, E., Jacquiel, A., Cally, R., Manoury, B., Vanden Berghe, T., *et al.* (2011). Fine-tuning nucleophosmin in macrophage differentiation and activation. *Blood* 118, 4694-4704.

Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13, 85-94.

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214-226.

*H*allsworth, M. P., Soh, C. P., Lane, S. J., Arm, J. P., and Lee, T. H. (1994). Selective enhancement of GM-CSF, TNF-alpha, IL-1 beta and IL-8 production by monocytes and macrophages of asthmatic subjects. *Eur Respir J* 7, 1096-1102.

Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282, 37298-37302.

Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774-785.

Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 251-262.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R., and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.

Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., and Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9-19.

Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A., and Jaattela, M. (2009). TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *Embo J* 28, 677-685.

Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J., and Wynn, T. A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1

by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol* 167, 6533-6544.

Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803.

Honda, S., Arakawa, S., Nishida, Y., Yamaguchi, H., Ishii, E., and Shimizu, S. (2014). Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat Commun* 5, 4004.

Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5, 973-979.

Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891-900.

Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K. X., and Guo, Y. J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 62, 1439-1451.

Huang, J., and Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37, 217-222.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.

Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A., and Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene* 18, 4523-4529.

Imhof, B. A., and Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4, 432-444.

Inglis, S. K., Collett, A., McAlroy, H. L., Wilson, S. M., and Olver, R. E. (1999). Effect of luminal nucleotides on Cl⁻ secretion and Na⁺ absorption in distal bronchi. *Pflugers Arch* 438, 621-627.

Inoue, K., Koizumi, S., Kataoka, A., Tozaki-Saitoh, H., and Tsuda, M. (2009). P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis. *Int Rev Neurobiol* 85, 159-163.

Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19, 5360-5372.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2009). Atg14 and UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes. *Autophagy* 5, 534-536.

Ito, M., and Matsuoka, I. (2008). Regulation of purinergic signaling by prostaglandin E2 in murine macrophages. *J Pharmacol Sci* 107, 443-450.

Ito, M., and Matsuoka, I. (2015). Inhibition of P2Y6 receptor-mediated phospholipase C activation and Ca(2+) signalling by prostaglandin E2 in J774 murine macrophages. *Eur J Pharmacol* 749, 124-132.

Itzykson, R., Fenaux, P., and Solary, E. (2013a). Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Pract Res Clin Haematol* 26, 387-400.

Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Gelsi-Boyer, V., Meggendorfer, M., Morabito, M., Berthon, C., Ades, L., Fenaux, P., Beyne-Rauzy, O., *et al.* (2013b). Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 31, 2428-2436.

Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Morabito, M., Preudhomme, C., Berthon, C., Ades, L., Fenaux, P., Platzbecker, U., Gagey, O., *et al.* (2013c). Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 121, 2186-2198.

*J*acob, F., Perez Novo, C., Bachert, C., and Van Crombruggen, K. (2013). Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 9, 285-306.

Jacquel, A., Benikhlef, N., Paggetti, J., Lalaoui, N., Guery, L., Dufour, E. K., Ciudad, M., Racœur, C., Micheau, O., Delva, L., *et al.* (2009). Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages. *Blood* 114, 3633-3641.

Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., and Lecureur, V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol* 281, 51-61.

Jia, W., and He, Y. W. (2011). Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy. *J Immunol* 186, 5313-5322.

Jitschin, R., Braun, M., Buttner, M., Dettmer-Wilde, K., Bricks, J., Berger, J., Eckart, M. J., Krause, S. W., Oefner, P. J., Le Blanc, K., *et al.* (2014). CLL-cells induce IDOhi CD14+HLA-DRlo myeloid-derived suppressor cells that inhibit T-cell responses and promote TRegs. *Blood* 124, 750-760.

Jourdan, M., Veyrune, J. L., De Vos, J., Redal, N., Couderc, G., and Klein, B. (2003). A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells. *Oncogene* 22, 2950-2959.

Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D. H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20, 1992-2003.

Jung, H. S., Chung, K. W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y. H., Kang, T. M., Yoon, K. H., Kim, J. W., *et al.* (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 8, 318-324.

Kamada, Y., Yoshino, K., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., and Ohsumi, Y. (2010). Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol* 30, 1049-1058.

Kang, T. B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., *et al.* (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173, 2976-2984.

Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S. A., and Ktistakis, N. T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci* 126, 5224-5238.

Kato, Y., Fujita, N., Yano, H., and Tsuruo, T. (1997). Suppression of experimental lung colonization of mouse colon adenocarcinoma 26 in vivo by an anti-idiotypic monoclonal antibody recognizing a platelet surface molecule. *Cancer Res* 57, 3040-3045.

Katoh, O., Takahashi, T., Oguri, T., Kuramoto, K., Mihara, K., Kobayashi, M., Hirata, S., and Watanabe, H. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res* 58, 5565-5569.

Keely, S. J., Calandrella, S. O., and Barrett, K. E. (2000). Carbachol-stimulated transactivation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase in T(84) cells is mediated by intracellular Ca²⁺, PYK-2, and p60(src). *J Biol Chem* 275, 12619-12625.

Kent, G., Minick, O. T., Volini, F. I., and Orfei, E. (1966). Autophagic vacuoles in human red cells. *Am J Pathol* 48, 831-857.

Kerbaui, D. M., Chyou, F., Gooley, T., Sorrow, M. L., Scott, B., Pagel, J. M., Myerson, D., Appelbaum, F. R., Storb, R., and Deeg, H. J. (2005). Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 11, 713-720.

Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K. L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152, 290-303.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the

membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151, 263-276.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., and Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 14, 377-391.

Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 931-937.

Knezevic, N., Tauseef, M., Thennes, T., and Mehta, D. (2009). The G protein betagamma subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin. *J Exp Med* 206, 2761-2777.

Ko, J. S., Rayman, P., Ireland, J., Swaidani, S., Li, G., Bunting, K. D., Rini, B., Finke, J. H., and Cohen, P. A. (2010a). Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res* 70, 3526-3536.

Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., *et al.* (2010b). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468, 839-843.

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B. V., Jacobson, K. A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091-1095.

Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., *et al.* (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 425-434.

Koren, I., Reem, E., and Kimchi, A. (2010). DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol* 20, 1093-1098.

Kukulski, F., Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F., Robson, S. C., Kirley, T. L., and Seigny, J. (2005). Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1, 193-204.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C. Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., Selak, M. A., Ney, P. A., and Thompson, C. B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* 112, 1493-1502.

Kuo, M. C., Liang, D. C., Huang, C. F., Shih, Y. S., Wu, J. H., Lin, T. L., and Shih, L. Y. (2009). RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-

terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia* 23, 1426-1431.

Lamb, C. A., Yoshimori, T., and Tooze, S. A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 759-774.

Laussmann, M. A., Passante, E., Dussmann, H., Rauen, J. A., Wurstle, M. L., Delgado, M. E., Devocelle, M., Prehn, J. H., and Rehm, M. (2011). Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell Death Differ* 18, 1584-1597.

Lawlor, K. E., van Nieuwenhuijze, A., Parker, K. L., Drake, S. F., Campbell, I. K., Smith, S. D., Vince, J. E., Strasser, A., and Wicks, I. P. (2013). Bcl-2 overexpression ameliorates immune complex-mediated arthritis by altering FcγRIIb expression and monocyte homeostasis. *J Leukoc Biol* 93, 585-597.

Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P. G., Harousseau, J. L., and Anderson, K. C. (2004). VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* 104, 2886-2892.

Lee, J. S., Li, Q., Lee, J. Y., Lee, S. H., Jeong, J. H., Lee, H. R., Chang, H., Zhou, F. C., Gao, S. J., Liang, C., and Jung, J. U. (2009). FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 11, 1355-1362.

Lee, P. S., Wang, Y., Dominguez, M. G., Yeung, Y. G., Murphy, M. A., Bowtell, D. D., and Stanley, E. R. (1999). The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *Embo J* 18, 3616-3628.

Lei, K., and Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2432-2437.

Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J. P., and Gachet, C. (2003). Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1941-1947.

Levine, R. L., Loriaux, M., Huntly, B. J., Loh, M. L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J. J., Willis, S. G., Nguyen, K. T., *et al.* (2005). The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106, 3377-3379.

Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74, 49-139.

Li, W. W., Li, J., and Bao, J. K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 69, 1125-1136.

Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672-676.

Lin, Y., Gustafson, M. P., Bulur, P. A., Gastineau, D. A., Witzig, T. E., and Dietz, A. B. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **117**, 872-881.

Lipinski, M. M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B. F., Ng, A., Xavier, R. J., Li, C., Yankner, B. A., Scherzer, C. R., and Yuan, J. (2010). Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14164-14169.

Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005a). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* **15**, 702-713.

Long, X., Ortiz-Vega, S., Lin, Y., and Avruch, J. (2005b). Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem* **280**, 23433-23436.

Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P. P., Sadiq, O., and Rubinsztein, D. C. (2012). Bim inhibits autophagy by recruiting Beclin 1 to microtubules. *Mol Cell* **47**, 359-370.

Luo, S., and Rubinsztein, D. C. (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* **17**, 268-277.

*M*acMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323-350.

Maelfait, J., Vercammen, E., Janssens, S., Schotte, P., Haegman, M., Magez, S., and Beyaert, R. (2008). Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 β maturation by caspase-8. *J Exp Med* **205**, 1967-1973.

Mammucari, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2008). Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* **4**, 524-526.

Mandruzzato, S., Solito, S., Falisi, E., Francescato, S., Chiarion-Sileni, V., Mocellin, S., Zanon, A., Rossi, C. R., Nitti, D., Bronte, V., and Zanovello, P. (2009). IL4 α myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* **182**, 6562-6568.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-686.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555.

- Mao, Y., Poschke, I., Wennerberg, E., Pico de Coana, Y., Egyhazi Brage, S., Schultz, I., Hansson, J., Masucci, G., Lundqvist, A., and Kiessling, R. (2013). Melanoma-educated CD14⁺ cells acquire a myeloid-derived suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer Res* **73**, 3877-3887.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A. C., Mazzulli, J., Mosharov, E. V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D. C., Follenzi, A., *et al.* (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* **118**, 777-788.
- Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**, 453-461.
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* **10**, 507-515.
- Massey, A. C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., and Cuervo, A. M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5805-5810.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**, 385-396.
- McIlwain, D. R., Berger, T., and Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a008656.
- Meggendorfer, M., Roller, A., Haferlach, T., Eder, C., Dicker, F., Grossmann, V., Kohlmann, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Ogawa, S., *et al.* SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood* **120**, 3080-3088.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J. H., Dubbelhuis, P. F., Helmond, M. T., Codogno, P., and Meijer, A. J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J Biol Chem* **281**, 34870-34879.
- Mercer, C. A., Kaliappan, A., and Dennis, P. B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**, 649-662.
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S. R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., and Rathmell, J. C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol* **186**, 3299-3303.
- Michiorri, S., Gelmetti, V., Giarda, E., Lombardi, F., Romano, F., Marongiu, R., Nerini-Molteni, S., Sale, P., Vago, R., Arena, G., *et al.* (2010). The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ* **17**, 962-974.

Mira, E., Lacalle, R. A., Gonzalez, M. A., Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Bernad, A., Martinez, A. C., and Manes, S. (2001). A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep* 2, 151-156.

Miura, M. (2012). Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 25, 1101-1104.

Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K., and Swanson, M. S. (2006). Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* 203, 1093-1104.

Momcilovic, M., Hong, S. P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem* 281, 25336-25343.

Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D., and Dabrowska, M. (2009). Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol* 130, 338-346.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., *et al.* (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20, 11-24.

Mortensen, M., Ferguson, D. J., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K. J., Komatsu, M., and Simon, A. K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 832-837.

Mueller, T. D., Zhang, J. L., Sebald, W., and Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 1592, 237-250.

Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., *et al.* (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13, 619-624.

Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y. G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A. W., Halenbeck, R., Cheng, H. Y., Gokhan, S., *et al.* (2013). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem* 288, 21972-21986.

Nandi, S., Gokhan, S., Dai, X. M., Wei, S., Enikolopov, G., Lin, H., Mehler, M. F., and Stanley, E. R. (2012). The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev Biol* 367, 100-113.

Naramura, M., Nandwani, N., Gu, H., Band, V., and Band, H. (2010). Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16274-16279.

Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455, 396-400.

Nikoloski, G., Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tonnissen, E. R., van der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenberghe, P., de Witte, T., *et al.* (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42, 665-667.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654-658.

Noronha-Matos, J. B., Costa, M. A., Magalhaes-Cardoso, M. T., Ferreira, F., Pelletier, J., Freitas, R., Neves, J. M., Sevigny, J., and Correia-de-Sa, P. (2012). Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y(6) receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women. *J Cell Physiol* 227, 2694-2709.

Nourshargh, S., and Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41, 694-707.

Nowak, J., Archange, C., Tardivel-Lacombe, J., Pontarotti, P., Pebusque, M. J., Vaccaro, M. I., Velasco, G., Dagorn, J. C., and Iovanna, J. L. (2009). The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 20, 870-881.

Oakhill, J. S., Chen, Z. P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. A., Ling, N., Macaulay, S. L., and Kemp, B. E. (2010). beta-Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19237-19241.

Obermajer, N., Muthuswamy, R., Lesnock, J., Edwards, R. P., and Kalinski, P. (2011). Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 5498-5505.

Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., and Rodriguez, P. C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 721s-726s.

Ogilvy, S., Metcalf, D., Print, C. G., Bath, M. L., Harris, A. W., and Adams, J. M. (1999). Constitutive Bcl-2 expression throughout the hematopoietic compartment affects multiple lineages and enhances progenitor cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14943-14948.

Ohta, K., Mizuno, A., Ueda, M., Li, S., Suzuki, Y., Hida, Y., Hayakawa-Yano, Y., Itoh, M., Ohta, E., Kobori, M., and Nakagawa, T. (2010). Autophagy impairment stimulates PS1 expression and gamma-secretase activity. *Autophagy* 6, 345-352.

Okuda, A., Furuya, K., and Kiyohara, T. (2003). ATP-induced calcium oscillations and change of P2Y subtypes with culture conditions in HeLa cells. *Cell Biochem Funct* 21, 61-68.

Onida, F., Kantarjian, H. M., Smith, T. L., Ball, G., Keating, M. J., Estey, E. H., Glassman, A. B., Albitar, M., Kwari, M. I., and Beran, M. (2002). Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 99, 840-849.

Oral, O., Oz-Arslan, D., Itah, Z., Naghavi, A., Deveci, R., Karacali, S., and Gozuacik, D. (2012). Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* 17, 810-820.

*P*adua, R. A., Carter, G., Hughes, D., Gow, J., Farr, C., Oscier, D., McCormick, F., and Jacobs, A. (1988). RAS mutations in myelodysplasia detected by amplification, oligonucleotide hybridization, and transformation. *Leukemia* 2, 503-510.

Pagliarini, V., Wirawan, E., Romagnoli, A., Ciccocanti, F., Lisi, G., Lippens, S., Cecconi, F., Fimia, G. M., Vandenabeele, P., Corazzari, M., and Piacentini, M. (2012). Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ* 19, 1495-1504.

Pak, A. S., Wright, M. A., Matthews, J. P., Collins, S. L., Petruzzelli, G. J., and Young, M. R. (1995). Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1, 95-103.

Pandit, R., Lathers, D. M., Beal, N. M., Garrity, T., and Young, M. R. (2000). CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109, 749-754.

Parekh, V. V., Wu, L., Boyd, K. L., Williams, J. A., Gaddy, J. A., Olivares-Villagomez, D., Cover, T. L., Zong, W. X., Zhang, J., and Van Kaer, L. (2013). Impaired autophagy, defective T cell homeostasis, and a wasting syndrome in mice with a T cell-specific deletion of Vps34. *J Immunol* 190, 5086-5101.

Parikh, S. A., and Tefferi, A. (2013). Chronic myelomonocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* 88, 967-974.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527-2534.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.

Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S., and Bronte, V. (2010). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 22, 238-244.

Perez, C., Martinez-Calle, N., Martin-Subero, J. I., Segura, V., Delabesse, E., Fernandez-Mercado, M., Garate, L., Alvarez, S., Rifon, J., Varea, S., *et al.* TET2 mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *PLoS One* 7, e31605.

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.

Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., and Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118, 2190-2199.

Pronier, E., Almiere, C., Mokrani, H., Vasanthakumar, A., Simon, A., da Costa Reis Monte Mor, B., Masse, A., Le Couedic, J. P., Pendino, F., Carbonne, B., *et al.* (2011). Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood* 118, 2551-2555.

Pua, H. H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., and He, Y. W. (2007). A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* 204, 25-31.

Pua, H. H., Guo, J., Komatsu, M., and He, Y. W. (2009). Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* 182, 4046-4055.

Pyo, J. O., Jang, M. H., Kwon, Y. K., Lee, H. J., Jun, J. I., Woo, H. N., Cho, D. H., Choi, B., Lee, H., Kim, J. H., *et al.* (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem* 280, 20722-20729.

*R*alevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492.

Rathinam, C., Thien, C. B., Flavell, R. A., and Langdon, W. Y. (2010). Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling. *Cancer Cell* 18, 341-352.

Ratjen, F., Durham, T., Navratil, T., Schaberg, A., Accurso, F. J., Wainwright, C., Barnes, M., and Moss, R. B. (2012). Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 11, 539-549.

Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., *et al.* (2007). Caspase-8 prevents sustained

activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 109, 1442-1450.

Reed, J. C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322-3330.

Reed, J. C., and Pellecchia, M. (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106, 408-418.

Rickles, F. R., and Falanga, A. (2001). Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 102, V215-224.

Roach, T. I., Rebres, R. A., Fraser, I. D., Decamp, D. L., Lin, K. M., Sternweis, P. C., Simon, M. I., and Seaman, W. E. (2008). Signaling and cross-talk by C5a and UDP in macrophages selectively use PLCbeta3 to regulate intracellular free calcium. *J Biol Chem* 283, 17351-17361.

Robson, S. C., Seigny, J., and Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2, 409-430.

Rodriguez, P. C., Ernstoff, M. S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R., and Ochoa, A. C. (2009). Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69, 1553-1560.

Rohde, C. M., Schrum, J., and Lee, A. W. (2004). A juxtamembrane tyrosine in the colony stimulating factor-1 receptor regulates ligand-induced Src association, receptor kinase function, and down-regulation. *J Biol Chem* 279, 43448-43461.

Rothwell, P. M., Wilson, M., Price, J. F., Belch, J. F., Meade, T. W., and Mehta, Z. (2012). Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 379, 1591-1601.

Rudolph, B. M., Loquai, C., Gerwe, A., Bacher, N., Steinbrink, K., Grabbe, S., and Tuettenberg, A. (2014). Increased frequencies of CD11b(+) CD33(+) CD14(+) HLA-DR(low) myeloid-derived suppressor cells are an early event in melanoma patients. *Exp Dermatol* 23, 202-204.

Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y. Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., and Guan, K. L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15, 741-750.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M. H., Uematsu, S., Yang, B. G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., *et al.* (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456, 264-268.

Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., *et al.* (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429, 75-79.

- Saleh, M. N., Goldman, S. J., LoBuglio, A. F., Beall, A. C., Sabio, H., McCord, M. C., Minasian, L., Alpaugh, R. K., Weiner, L. M., and Munn, D. H. (1995). CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85, 2910-2917.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496-1501.
- Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S. K., Schumacher, A., Prchal, J. T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454, 232-235.
- Santiago-Perez, L. I., Flores, R. V., Santos-Berrios, C., Chorna, N. E., Krugh, B., Garrad, R. C., Erb, L., Weisman, G. A., and Gonzalez, F. A. (2001). P2Y₂ nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 187, 196-208.
- Schauer, D., Starlinger, P., Reiter, C., Jahn, N., Zajc, P., Buchberger, E., Bachleitner-Hofmann, T., Bergmann, M., Stift, A., Gruenberger, T., and Brostjan, C. (2012). Intermediate monocytes but not TIE2-expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PLoS One* 7, e44450.
- Schlitt, A., Heine, G. H., Blankenberg, S., Espinola-Klein, C., Dopheide, J. F., Bickel, C., Lackner, K. J., Iz, M., Meyer, J., Darius, H., and Rupprecht, H. J. (2004). CD14⁺CD16⁺ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost* 92, 419-424.
- Schmielau, J., and Finn, O. J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 61, 4756-4760.
- Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K. K., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2013). Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y₂ receptor. *Cancer Cell* 24, 130-137.
- Schweers, R. L., Zhang, J., Randall, M. S., Loyd, M. R., Li, W., Dorsey, F. C., Kundu, M., Opferman, J. T., Cleveland, J. L., Miller, J. L., and Ney, P. A. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19500-19505.
- Selimoglu-Buet, D., Wagner-Ballon, O., Saada, V., Bardet, V., Itzykson, R., Bencheikh, L., Morabito, M., Met, E., Debord, C., Benayoun, E., *et al.* (2015). Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*.

- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *Embo J* 18, 5234-5241.
- Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K., Albelda, S. M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179, 977-983.
- Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 427-439.
- Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100, 4446-4453.
- Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci* 29, 13578-13588.
- Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006). Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol* 26, 5933-5945.
- Stanley, E. R., Chen, D. M., and Lin, H. S. (1978). Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* 274, 168-170.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292.
- Stitzel, M. L., and Seydoux, G. (2007). Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Science* 316, 407-408.
- Strappazzon, F., Vietri-Rudan, M., Campello, S., Nazio, F., Florenzano, F., Fimia, G. M., Piacentini, M., Levine, B., and Cecconi, F. (2011). Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *Embo J* 30, 1195-1208.
- Such, E., Cervera, J., Costa, D., Sole, F., Vallespi, T., Luno, E., Collado, R., Calasanz, M. J., Hernandez-Rivas, J. M., Cigudosa, J. C., *et al.* (2011). Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 96, 375-383.
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11, 6713-6721.
- Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 581, 2156-2161.

Szymczyk, K. H., Freeman, T. A., Adams, C. S., Srinivas, V., and Steinbeck, M. J. (2006). Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 209, 836-844.

Tacke, F., and Randolph, G. J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211, 609-618.

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., Mule, J. J., *et al.* (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9, 1142-1151.

Tamas, P., Hawley, S. A., Clarke, R. G., Mustard, K. J., Green, K., Hardie, D. G., and Cantrell, D. A. (2006). Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes. *J Exp Med* 203, 1665-1670.

Taneike, M., Yamaguchi, O., Nakai, A., Hikoso, S., Takeda, T., Mizote, I., Oka, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., *et al.* (2010). Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* 6, 600-606.

Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* 10, 1367-1379.

Tatur, S., Kreda, S., Lazarowski, E., and Grygorczyk, R. (2008). Calcium-dependent release of adenosine and uridine nucleotides from A549 cells. *Purinergic Signal* 4, 139-146.

Terman, A., and Brunk, U. T. (2005). Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc Res* 68, 355-365.

Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., and *et al.* (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Toman, R. E., Payne, S. G., Watterson, K. R., Maceyka, M., Lee, N. H., Milstien, S., Bigbee, J. W., and Spiegel, S. (2004). Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J Cell Biol* 166, 381-392.

Torocsik, D., Bardos, H., Nagy, L., and Adany, R. (2005). Identification of factor XIII-A as a marker of alternative macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* 62, 2132-2139.

Traves, P. G., Pimentel-Santillana, M., Carrasquero, L. M., Perez-Sen, R., Delicado, E. G., Luque, A., Izquierdo, M., Martin-Sanz, P., Miras-Portugal, M. T., and Bosca, L. (2013). Selective impairment of P2Y signaling by prostaglandin E2 in macrophages: implications for Ca²⁺-dependent responses. *J Immunol* 190, 4226-4235.

Tsigelny, I. F., Bar-On, P., Sharikov, Y., Crews, L., Hashimoto, M., Miller, M. A., Keller, S. H., Platoshyn, O., Yuan, J. X., and Masliah, E. (2007). Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein. *Febs J* 274, 1862-1877.

Tsukamoto, S., Kuma, A., and Mizushima, N. (2008a). The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy* 4, 1076-1078.

Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., and Mizushima, N. (2008b). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* 321, 117-120.

Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjana, Y., Young, C., Jensen, O. N., Xu, C. F., Neubert, T. A., Skoda, R. C., Hubbard, S. R., and Silvennoinen, O. (2011). The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol* 18, 971-976.

Vainchenker, W., and Constantinescu, S. N. (2013). JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* 32, 2601-2613.

Van der Geer, P., and Hunter, T. (1991). Tyrosine 706 and 807 phosphorylation site mutants in the murine colony-stimulating factor-1 receptor are unaffected in their ability to bind or phosphorylate phosphatidylinositol-3 kinase but show differential defects in their ability to induce early response gene transcription. *Mol Cell Biol* 11, 4698-4709.

Van Furth, R. (1980). The mononuclear phagocyte system. *Verh Dtsch Ges Pathol* 64, 1-11.

Van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., and Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 46, 845-852.

Van Valckenborgh, E., Schouppe, E., Movahedi, K., De Bruyne, E., Menu, E., De Baetselier, P., Vanderkerken, K., and Van Ginderachter, J. A. (2012). Multiple myeloma induces the immunosuppressive capacity of distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the bone marrow. *Leukemia* 26, 2424-2428.

Vasquez-Dunddel, D., Pan, F., Zeng, Q., Gorbounov, M., Albesiano, E., Fu, J., Blosser, R. L., Tam, A. J., Bruno, T., Zhang, H., *et al.* (2013). STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *J Clin Invest* 123, 1580-1589.

Vince, J. E., Wong, W. W., Gentle, I., Lawlor, K. E., Allam, R., O'Reilly, L., Mason, K., Gross, O., Ma, S., Guarda, G., *et al.* (2012). Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation. *Immunity* 36, 215-227.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 70, 3052-3061.

Walkley, C. R., Yuan, Y. D., Chandraratna, R. A., and McArthur, G. A. (2002). Retinoic acid receptor antagonism in vivo expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. *Leukemia* 16, 1763-1772.

Wang, J., Roderiquez, G., Oravecz, T., and Norcross, M. A. (1998). Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol* 72, 7642-7647.

Wang, L., Chang, E. W., Wong, S. C., Ong, S. M., Chong, D. Q., and Ling, K. L. (2013a). Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* 190, 794-804.

Wang, R. C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012). Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338, 956-959.

Wang, Y., Sun, Y., Li, D., Zhang, L., Wang, K., Zuo, Y., Gartner, T. K., and Liu, J. (2013b). Platelet P2Y₁₂ is involved in murine pulmonary metastasis. *PLoS One* 8, e80780.

Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A., and Roach, P. J. (2001). Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol Cell Biol* 21, 5742-5752.

Warny, M., Aboudola, S., Robson, S. C., Sevigny, J., Communi, D., Soltoff, S. P., and Kelly, C. P. (2001). P2Y₆ nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276, 26051-26056.

Wattel, E., Guerci, A., Hecquet, B., Economopoulos, T., Copplestone, A., Mahe, B., Couteaux, M. E., Resegotti, L., Voglova, V., Foussard, C., *et al.* (1996). A randomized trial of hydroxyurea versus VP16 in adult chronic myelomonocytic leukemia. Groupe Francais des Myelodysplasies and European CMML Group. *Blood* 88, 2480-2487.

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y. G., Yu, W., Huang, M., Williams, L. T., Lin, H., and Stanley, E. R. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88, 495-505.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30, 678-688.

White, N., Ryten, M., Clayton, E., Butler, P., and Burnstock, G. (2005). P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. *Cancer Lett* 224, 81-91.

Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., *et al.* (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 1, e18.

Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J., Ong, S. M., Dang, T. M., and Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53, 41-57.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13, 2004-2008.

Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Haire, L. F., *et al.* Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472, 230-233.

Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., and Stefanis, L. (2009). Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS One* 4, e5515.

Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis. *Autophagy* 4, 917-919.

Yeung, Y. G., Jubinsky, P. T., Sengupta, A., Yeung, D. C., and Stanley, E. R. (1987). Purification of the colony-stimulating factor 1 receptor and demonstration of its tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1268-1271.

Yoo, J., Rodriguez Perez, C. E., Nie, W., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2013). TNF-alpha and LPA promote synergistic expression of COX-2 in human colonic myofibroblasts: role of LPA-mediated transactivation of upregulated EGFR. *BMC Gastroenterol* 13, 90.

Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., *et al.* (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478, 64-69.

Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D. I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181, 5791-5802.

Young, J. D., Ko, S. S., and Cohn, Z. A. (1984). The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5430-5434.

Young, M. M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A. K., Amin, S., Hu, C. D., Zhang, J., *et al.* (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 287, 12455-12468.

Young, M. R., Petruzzelli, G. J., Kolesiak, K., Achille, N., Lathers, D. M., and Gabrilovich, D. I. (2001). Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells. *Hum Immunol* 62, 332-341.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8, 1124-1132.

Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., *et al.* (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 465, 942-946.

Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., *et al.* (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10, 285-292.

Zanin, R. F., Braganhol, E., Bergamin, L. S., Campesato, L. F., Filho, A. Z., Moreira, J. C., Morrone, F. B., Seigny, J., Schetinger, M. R., de Souza Wyse, A. T., and Battastini, A. M. (2012). Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* 7, e31205.

Zaslona, Z., Serezani, C. H., Okunishi, K., Aronoff, D. M., and Peters-Golden, M. (2012). Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoid receptor 2/protein kinase A signaling. *Blood* 119, 2358-2367.

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193, 247-254.

Zhang, Y., Morgan, M. J., Chen, K., Choksi, S., and Liu, Z. G. (2012). Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood* 119, 2895-2905.

Zhang, Z., Wang, Z., Ren, H., Yue, M., Huang, K., Gu, H., Liu, M., Du, B., and Qian, M. (2011). P2Y(6) agonist uridine 5'-diphosphate promotes host defense against bacterial infection via monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocytes/macrophages recruitment. *J Immunol* 186, 5376-5387.

Zhao, G., Zhang, J. G., Liu, Y., Qin, Q., Wang, B., Tian, K., Liu, L., Li, X., Niu, Y., Deng, S. C., and Wang, C. Y. (2013). miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPKalpha1. *Mol Cancer Ther* 12, 83-93.

Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11, 468-476.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Strobel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schutt, C., Passlick, B., and Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23, 2053-2058.

Ziegler-Heitbrock, H. W., and Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14, 121-125.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584-592.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. *Science* 334, 678-683.

ANNEXES

Article 3

Targeting cancer stem cells expressing an embryonic signature with anti-proteases to decrease their tumor potential.

Article publié dans le journal **Cell Death and Diseases**, 2013

CY. Darini, P. Martin, S. Azoulay, MD. Drici, P. Hofman, S. Obba, C. Dani, A. Ladoux.

Article 4

Escherichia coli α -Hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the RhoGTPase activating toxin CNF1 during bacteremia.

Publié dans le journal **PLOS Pathogens** , 2015

M. Diabate, P. Munro, E. Garcia, A. Jacquell, G. Michel, **S. Obba**, D. Goncalves, C. Luci, S. Marchetti, D. Demon, C. Degos, Y. Bechah, J-L Mege, M Lamkanfi, P. Auberger, J-P. Gorvel, L.M. Stuart , L. Landraud, E. Lemichez and L. Boyer